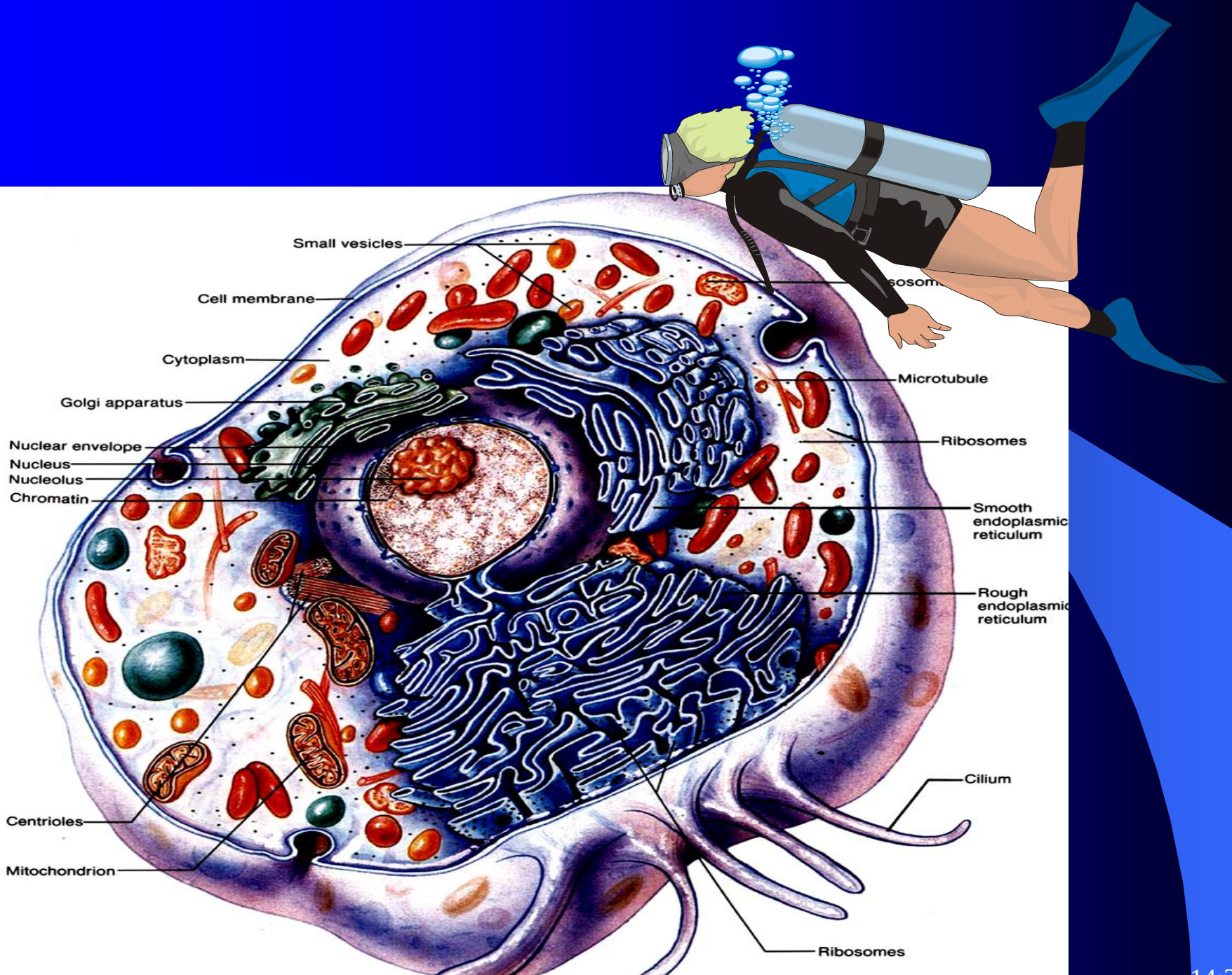


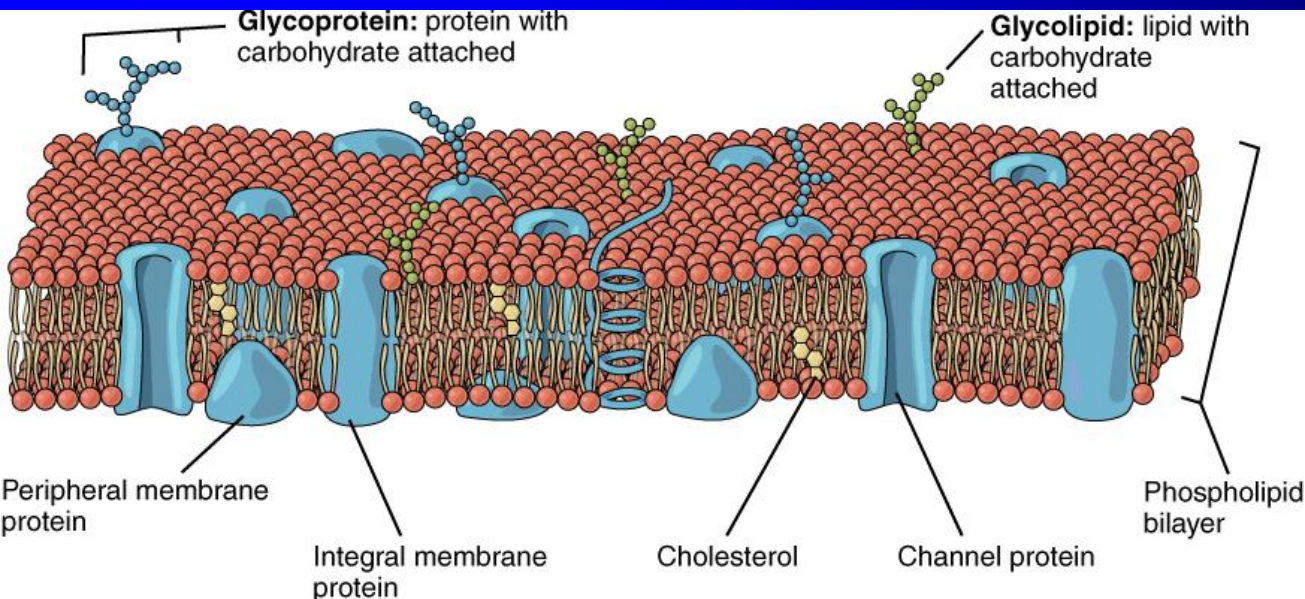
Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації



КОСТЕНКО
ВІТАЛІЙ
ОЛЕКСАНДРОВИЧ,
доктор медичних наук,
професор,



Біологічні мембрани є одними із найважливіших структурних утворень клітини. Плазматична мембрана (ПМ) і комплекс внутрішньоклітинних мембран ендоплазматичного ретикулума, апарату Гольджі, мембран ядер, мітохондрій, лізосом, пероксисом, піно- і фагосом окрім суто механічної, бар'єрної функції, залучені в безліч фізіологічних і біохімічних процесів, притаманних відповідним органелам і клітині загалом.



Усі фосfolіпіди – як гліцери- так і сфінго- – є амфiфiльними сполуками



Амфiфiльні властивості фосfolіпiдiв

Рiдинно-мозаїчна структура
плазматичної мембрани

Хімічний склад типових мембран

Мембрани складаються з **ліпідних і білкових** молекул, відносна кількість яких варіює (від 20 % - білок + 80 % - ліпіди до 75 % - білок + 25 % ліпіди) у різних мембран.

Вуглеводи містяться в формі глікопротеїнів, гліколіпідів і складають 0,5- 10 % речовини мембрани.

МЕМБРАНА	БЕЛКИ, %	ЛИПИДЫ, %	УГЛЕВОДЫ, %
МИЕЛИН	18	79	3
ЭРИТРОЦИТ ЧЕЛОВЕКА	49	43	8
ПЕЧЕНЬ МЫШИ	44	52	4
АМЕБА	54	42	4
ГАЛОБАКТЕРИЯ	75	25	0
МИТОХОНДРИЯ (ВНУТРЕННЯЯ МЕМБРАНА)	76	24	0

Ліпіди клітинних структур еукаріотів представлені 3-ма основними групами: фосфоліпіди, гліколіпіди та стероїди.

Липидный состав некоторых биологических мембран
(в % от общего их количества)

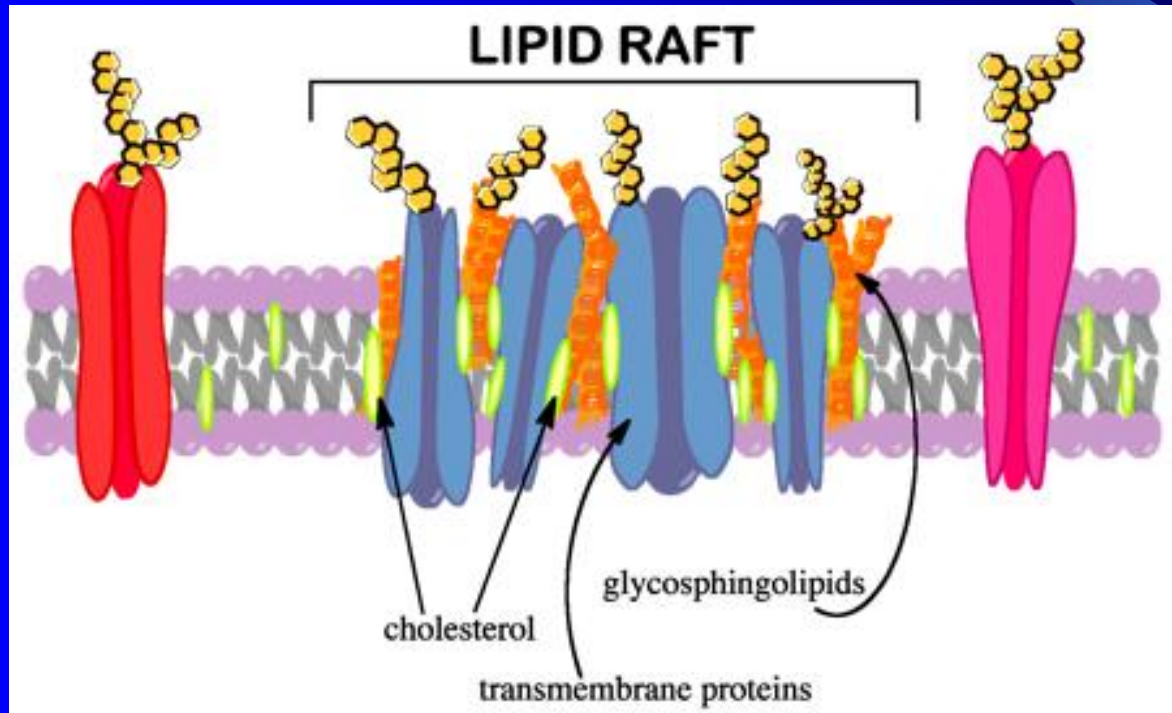
Липид	Эритроциты человека	Миелин человека	Митохондрии сердца быка	E. coli
Фосфатидная кислота	1,5	0,5	0,0	0
Фосфатидилхолин	19,0	10,0	39,0	0
Фосфатидилэтаноламин	18,0	20,0	27,0	66
Фосфатидилглицерол	0,0	0,0	0,0	18
Фосфатидилинозит	1,0	1,0	7,0	0
Фосфатидилсерин	8,5	8,5	0,5	0
Кардиолипин	0,0	0,0	22,5	12
Сфингомиелин	17,5	8,5	0,0	0
Гликолипиды	10,0	26,0	0,0	0
Холестерол	25,0	26,0	3,0	0

Распространенные жирные кислоты в составе мембранных липидов

Соединение	Тривиальное название	Молекулярная масса, Да	Температура плавления, °0
C _{12:0}	лауриловая	200,3	44,2
C _{14:0}	миристиновая	228,4	53,9
C _{16:0}	пальмитиновая	256,4	63,1
C _{17:0}	маргариновая	270,4	61,3
C _{18:0}	стеариновая	284,5	69,6
C _{20:0}	арахиновая	312,5	76,5
C _{22:0}	бегеновая	340,6	81,5
C _{24:0}	лигноцериновая	368,5	86,0
C _{16:1(9)}	пальмитоолеиновая	254,4	-0,5
C _{18:1(9c)}	олеиновая	282,5	13,5
C _{18:1(9t)}	элаидиновая	282,5	44,5
C _{18:1(7)}	вакценовая	282,5	44,0
C _{24:1(9)}	нервоновая	366,6	42,5
C _{18:2(9, 12)}	линолевая	280,5	-5,0
C _{18:3(9, 12, 15)}	линоленовая	278,4	-10,0
C _{20:4(5, 8, 11, 14)}	арахидоновая	304,5	-49,5
C _{22:5(7, 10, 13, 16, 19)}	клубанодоновая	330,5	-45,0
C _{22:6(4,7, 10, 13, 16, 19)}	докозогексаеновая	328,5	-44,1

Теорія ліпідних рафтів, Кай Зимонс (1997 р.)

Ліпідний рафт (Lipid raft) – мікродомен ліпідного бішару мембрани, збагачений холестеролом, сфінголіпідами та насиченими фосфоліпідами. Звідси й асоціація з своєрідним «плотом» (ділянкою щільноупакованого ліпиду), що вільно дрейфує на поверхні «рідкого» фосфоліпиду.

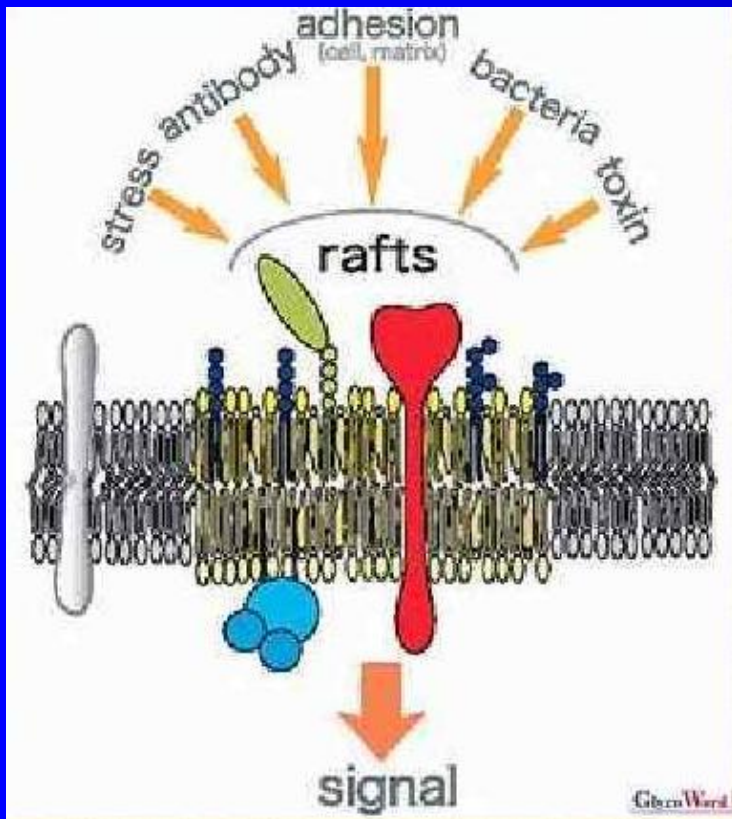


Білки, асоційовані з ліпідними рафтами, та їхні функції

Білки	Функції
GPI-заякорені білки	Численні сигнальні механізми
Флотиліни	Поглинання холерного токсину й ендоцитоз GPI-заякорених білків
Тирозинові протеїнкінази родини Src	Фосфорилування білків за залишками тирозину
Рецептори до епідермального фактора росту (<i>epidermal growth factor receptors, EGFR</i>)	Зв'язує такі ліганди, як епідермальний фактор росту (<i>epidermal growth factor, EGF</i>) та трансформуючий фактор росту (<i>transforming growth factor α, TGFα</i>)
Рецептори до тромбоцитарного фактора росту (<i>platelet derived growth factor receptors, PDGFR</i>)	Регулюють клітинну проліферацію, диференціювання, ріст і розвиток клітин
Рецептори до ендотеліну	Гомеостаз кальцію
Тирозинова протеїнфосфатаза Src	Сигнальна трансдукція, зв'язується з активованим PDGFR
Білок-2, зв'язаний із рецепторами фактора росту	Сигнальна трансдукція, проліферація численних типів клітин
MAP-кінази	Експресія генів, мітоз, диференціювання, проліферація, виживання або апоптоз клітин
Протеїнкіназа C	Фосфорилування ОН-груп залишків серину і треоніну у складі білків та контроль функцій останніх

Функція ліпідних рафтів

Вважають, що ліпідні рафти, «сходячись» і «розходячись» у мембрані, як кораблі в морі, регулюють проведення сигналу ззовні всередину клітини. Сигнали при цьому можуть бути найрізноманітніші: від клітинного самогубства (апоптозу) до активації клітинного поділу та прикріплення до субстрату.

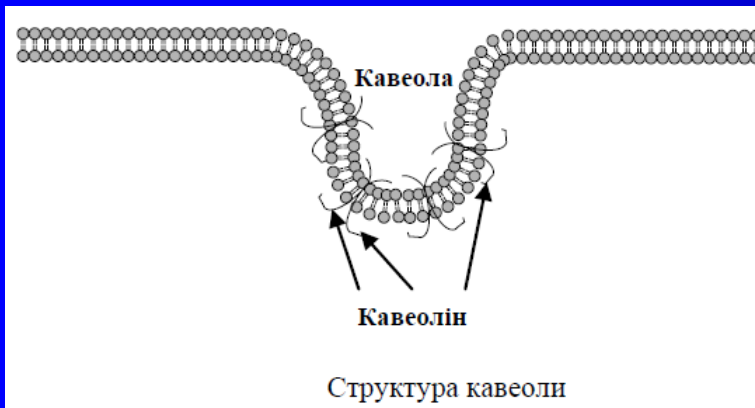


Для молекулярної медицини рафти стали відсутньою ланкою в механізмах розвитку багатьох захворювань. Так, виявлено, що віруси (в т.ч. ВІЛ) вибирають своєю мішенню в клітинній мембрані саме ліпідні «плоти», закидають туди міцний «якір», після чого починають своє проникнення в клітину.

Кавеоли – різновид ліпідних рафтів

Кавеоли – спеціалізовані ліпідні угруповання, що мають вигляд «впинань» (50–100 нм) плазматичної мембрани.

Виявляються в гладеньком'язових, ендотеліальних клітинах, фібробластах, макрофагах і адипоцитах.



Містять рецептори-«уловлювачі» (**scavenger receptors**) класу В (зокрема SR-B1 – уловлювач ЛПВЩ, ЛПНЩ, аніонних фосфоліпідів, апоптотичних клітин, тригліцеридів, токоферолів; CD36 – уловлювач окиснених ЛПНЩ (окЛПНЩ), жирних кислот, аніонів фосфоліпідів, апоптотичних клітин). На відміну від ліпідних рафтів, кавеоли містять білки **кавеоліни**, які виступають маркером цих структур.

Кавеолін:

- 1) відіграє роль "**каркасу**", що забезпечує вірну локалізацію сигнальних білків;
- 2) виступає **інгібітором** низки приєднаних до нього **білків**, зокрема, eNOS, аденілатциклази, низки кіназ і серин/треонінових фосфатаз.

Отже, кавеолін може слугувати негативним регулятором численних внутрішньоклітинних шляхів.

Номенклатура ліпідних рафтів

Suggested raft nomenclature

	I. Rafts	II. Clustered rafts	III. DRMs	IV. Caveolae
Components	• Glycosphingolipids • Cholesterol • Lipid-modified proteins containing saturated acyl chains: – GPI-anchored proteins – Doubly acylated Src-type kinases • Transmembrane proteins	• Rafts clustered by: – Antibody – Lectin – Adjacent cell proteins – Physiological crosslinking proteins	• Rafts remaining insoluble after treatment on ice with detergent‡§: Triton X-100 (most popular), Brij-58, CHAPS, NP-40	• Raft proteins and lipids • Caveolins
Properties	• 50 nanometres in diameter • Mobile ($\sim 10^{-8}$ cm² sec⁻¹) • Liquid-ordered phase	• Large, often hundreds of nanometres to micrometres in size • Often bound to cytoskeleton	• Float to low density in sucrose or Optiprep™ density gradients	• Morphological 'cave-like' invaginations on the cell surface
Comments	• Native rafts are only detected in living cells	• Clustering is used both artificially and physiologically to trigger signalling cascades	• Non-native (aggregated) raft • Variable effects depending on: – Detergent type – Detergent:lipid ratio – Cell type	• Raft subcategory • Highly specialized

* DRM, detergent-resistant membrane; DIG, detergent-insoluble glycolipid-rich domain; DIC, detergent-insoluble complex; LDM, low-density membrane; DIM, detergent-insoluble material; GEM, glycolipid-enriched membrane; TIFF, Triton X-100 insoluble floating fraction.

‡Care should be taken when choosing solubilization conditions for co-immunoprecipitation experiments, as these popular detergents do not solubilize rafts on ice.

Co-localization of proteins in rafts or DRMs could be mistaken for direct protein–protein interactions if rafts are not completely solubilized.

§Rafts can be solubilized in octyl glucoside or in the detergents listed above at raised temperatures.

Simons, Kai and Derek Toomre. "Lipid rafts and signal transduction." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (2000): 31-39.

The diagram illustrates the B cell receptor (BCR) signaling pathway. A multivalent antigen binds to the BCR, which is composed of α and β chains. The BCR is associated with IgE and LAT. The BCR is also associated with a Raft. The Raft contains ITAM motifs (blue and red) and is associated with Lyn and Syk kinases. The signaling pathway involves phosphorylation of the ITAM motifs (1, 2, 3) and recruitment of Syk (4), leading to downstream signals.

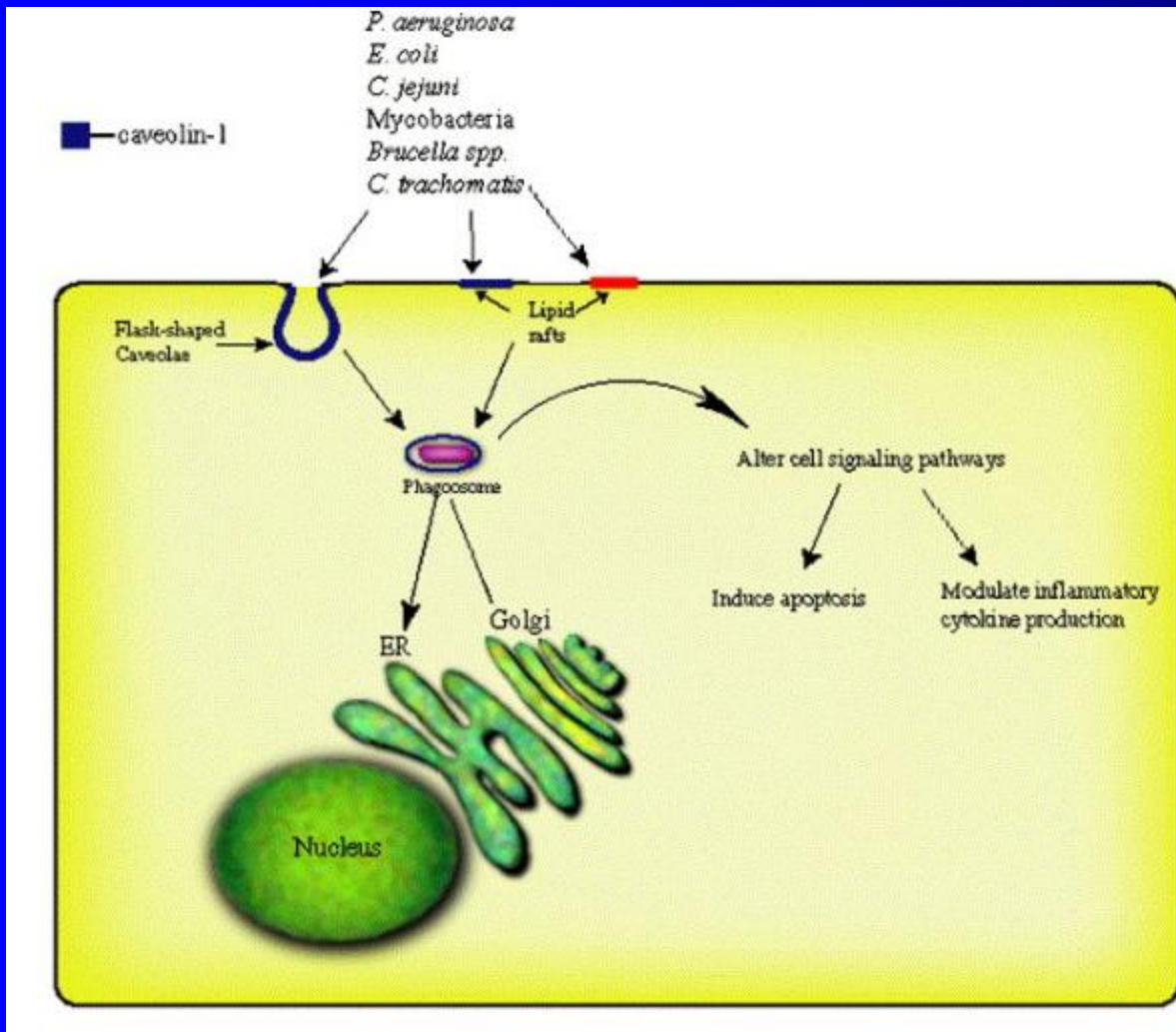
Antigen presenting cell

MHC

1

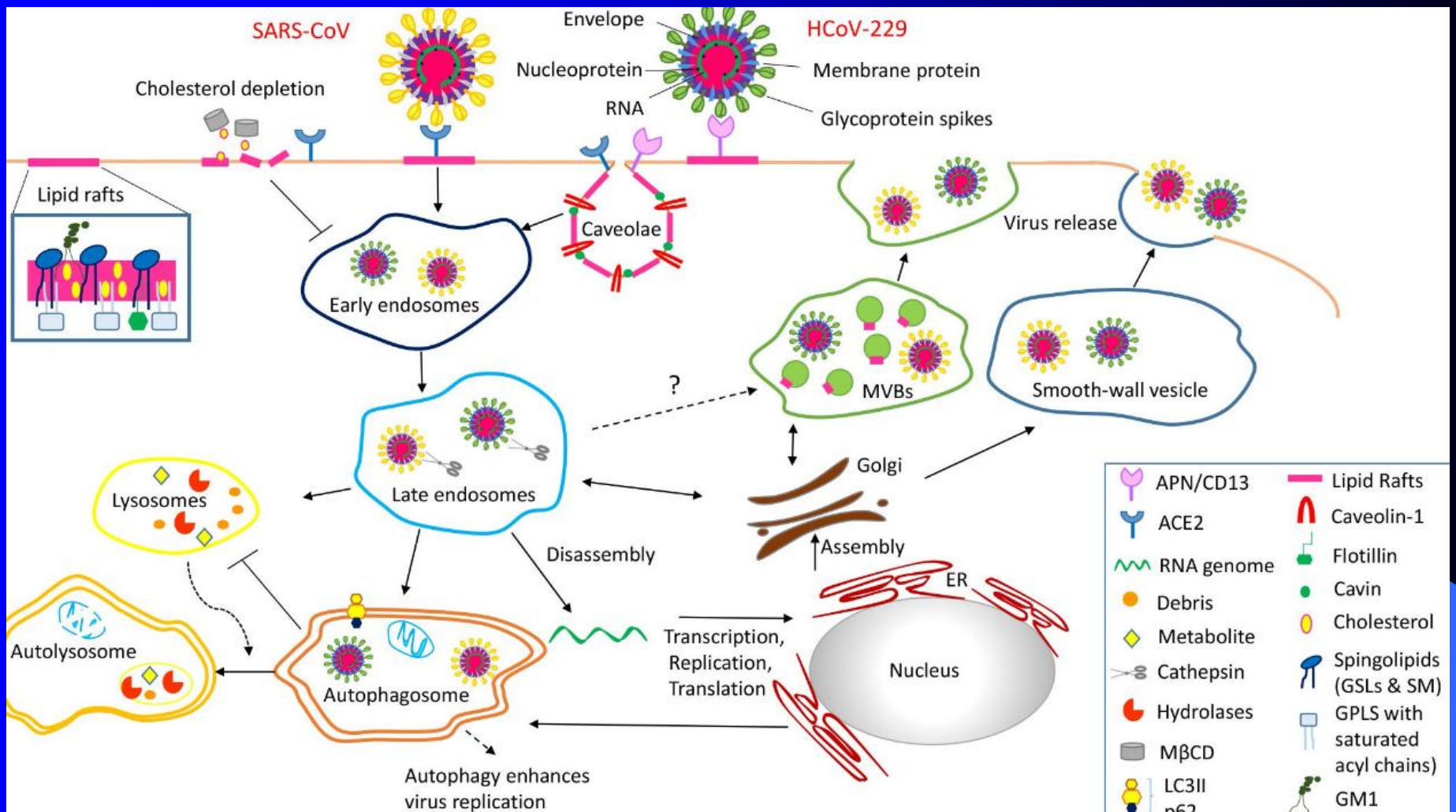
Simons, Kai and Derek Toomre. "Lipid rafts and signal transduction." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (2000): 31-39.

Ліпідні рафти та патогенез інфекційних захворювань



Zaas, David & Duncan, Matthew & Wright, Jo & Abraham, Soman. (2006). The role of lipid rafts in the pathogenesis of bacterial infections. *Biochimica et biophysica acta*. 1746. 305-13.

Schematic diagram showing the complex role of caveolae and lipid rafts in bacterial pathogenesis. Bacteria that co-opt this endocytic pathway are able to survive intracellularly and avoid fusion with traditional lysosomes. These bacteria can use caveolae or lipid raft-mediated endocytosis and be targeted to a number of different intracellular compartments. Bacterial entry through lipid rafts also allows alteration of cell signaling pathways including inflammatory cytokine production and induction of apoptosis.



MINI REVIEW article

Front. Microbiol. 11 August 2020 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01821>



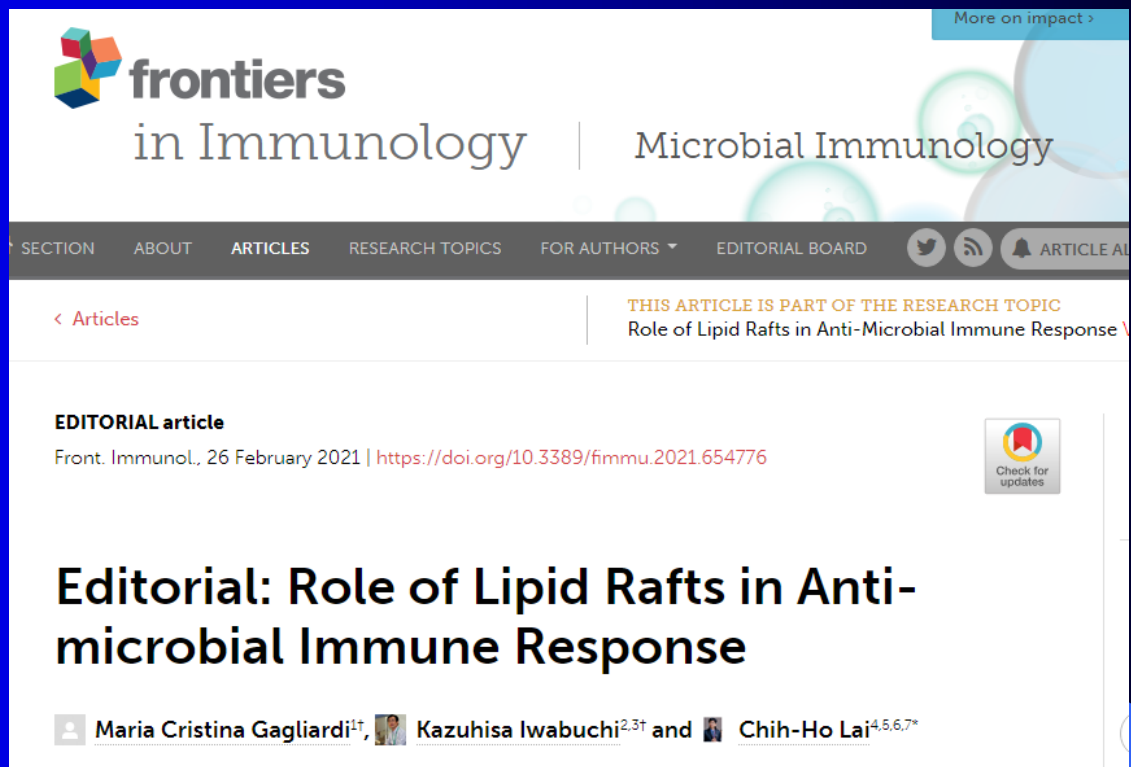
Coronavirus Interplay With Lipid Rafts and Autophagy Unveils Promising Therapeutic Targets

Katia Fecchi¹, Simona Anticoli¹, Daniela Peruzzo¹, Elisabetta Iessi¹, Maria Cristina Gagliardi¹, Paola Matarrese¹ and Anna Ruggieri¹

Reference Center for Gender Specific Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

ACE2 - angiotensin converting enzyme 2

MβCD - methyl-β-cyclodextrin

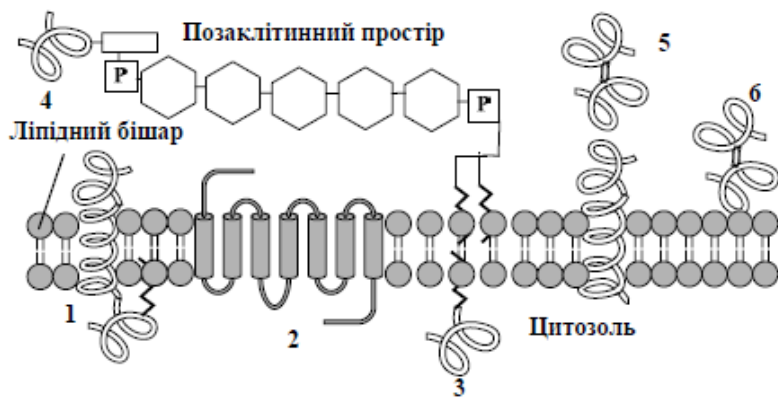


Disruption of the **raft** architecture by treating cells with **methyl- β -cyclodextrin** (M β CD) or **statins***, the most common agents used to disrupt lipid rafts, may be an ideal strategy to reduce SARS-CoV-2 infection.

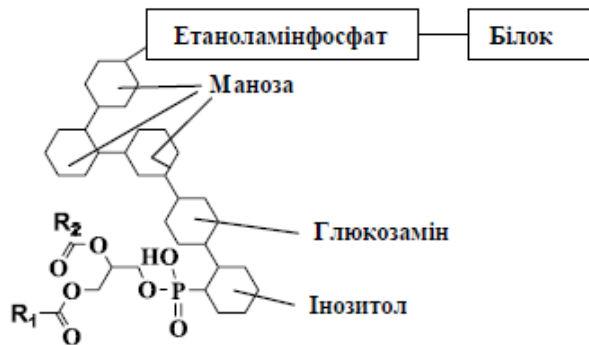
* Статини – інгібітори 3-гідрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктази (ГОМК-КоА-редуктази), ферменту, залученого в біосинтез холестеролу (каталізує перетворення ГОМК-КоА на мевалонову кислоту).

Мембранні білки

- *транспортні білки* (АТФази, іонні канали, білки-переносники);
- *білки-ферменти* (інтегральні – АТФази; периферійні – ацетилхолінестераза, лужна і кисла фосфатази, РНКаза);
- *сигнальні білки* (білки-рецептори (як інтегральні, так і периферійні), G-білки);
- *білки, залучені у розпізнавання іншими клітинами* (низка глікопротеїнів слугують мішенями, які специфічно розпізнаються мембранними білками інших клітин);
- *білки міжклітинних контактів* (наприклад, білки, які беруть участь у створенні щільних та щілинних контактів)
- *структурні білки* (зокрема, мембранні білки, розташовані з цитозольного боку мембрани, можуть взаємодіяти із білками цитоскелета, тоді як білки, локалізовані на позаклітинному боці мембрани, можуть сполучатися з фібрилами позаклітинного матриксу)



А



Б

А – способи прикріплення білкових молекул до ліпідного бішару: 1 – інтегральний монотопний (1-TMS) білок; 2 – інтегральний політопний (7-TMS) білок; деякі із цих моно- та політопних білків можуть додатково заякорюватися в один із моношарів мембрани за допомогою ковалентно приєднаної жирної кислоти (1); 3 – "заякорений" білок, приєднаний до мембрани через жирну кислоту або ізопреноїдний залишок; 4 – "заякорений" білок, ковалентно приєднаний до розташованого в зовнішньому моношарі мембрани глікозилизованого фосфатидилінозиту (GPI); 5, 6 – периферійні білки, які не мають гідрофобних ділянок, а містять заряджені частини, що взаємодіють з іншими білками (5) або з фосфатними групами фосфоліпідів. Б – структура GPI-якоря

Скорочення:

1-TMS-рецептори (1 transmembrane α -helices receptors) – рецептори з 1 трансмембранною α -спіраллю (інтегральні білки, поліпептидний ланцюг яких 1 раз перетинає ПМ, наприклад, рецепторні тирозинові протеїнкінази)

7-TMS-рецептори (7-transmembrane α -helices receptors) – рецептори з 7 трансмембранними α -спіралями (інтегральні білки, поліпептидний ланцюг яких 7 разів перетинає ПМ, наприклад, метаботропні рецептори)

GPI – фосфатидилінозитол

Функції мембран

Плазматична мембрана виконує у клітині *бар'єрну* (ПМ, як і ендомембрани, є напівпроникною), *транспортну* (яка зумовлена наявністю транспортних білків), *сигнальну* (залучається в передачу сигналів від гормонів, нейромедіаторів, факторів росту та інших біологічно активних сполук), *адгезивну функції* (бере участь у міжклітинній адгезії).

Ендомембрани поділяють клітину на *компартменти*, у яких здійснюються *специфічні функції*: синтез біомолекул (ендоплазматичний ретикулум), відтворення генетичної інформації (ядро), генерація енергії (мітохондрії), вивільнення продуктів життєдіяльності (апарат Гольджі).

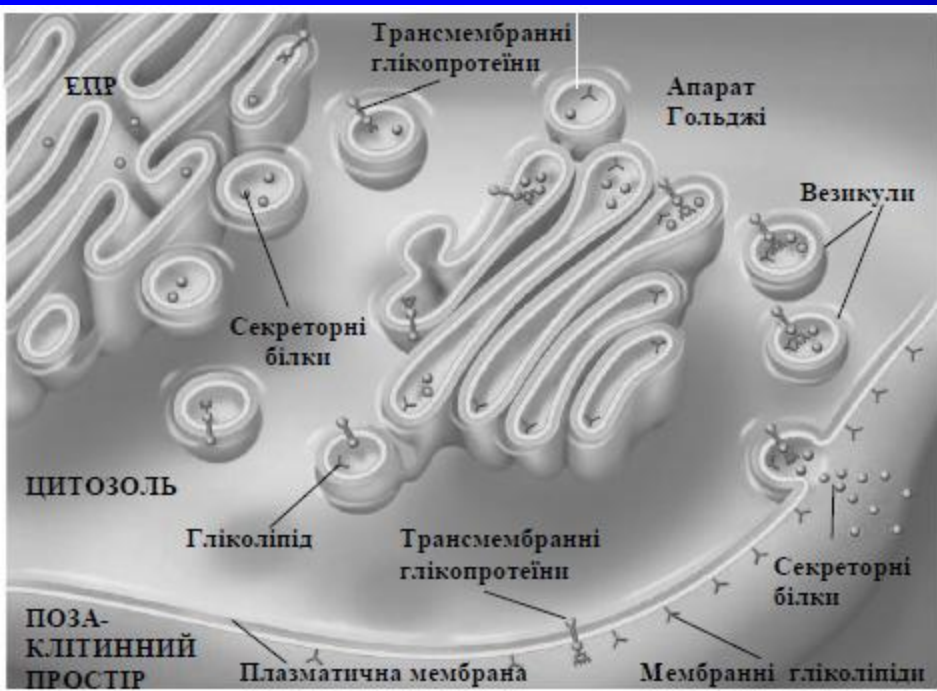


Схема участі ЕПР та АГ у біосинтезі біологічних мембран. Мембранні ліпіди й білки синтезуються в ЕПР; там же із мембранных білків утворюються глікопротеїни. В АГ здійснюється додаткова модифікація вуглеводної частини глікопротеїнів, а також утворюються гліколіпіди. Надалі глікопротеїни, гліколіпіди разом із секреторними білками у складі везикул спрямовуються до ПМ. Унаслідок наступного злиття везикулярної та плазматичної мембрани внутрішня поверхня мембрани везикули стає частиною зовнішнього моношару ПМ, зовнішня її поверхня – частиною внутрішнього моношару, а секреторні білки вивільнюються в позаклітинний простір

У **гранулярному (шорсткому) ЕПР** утворюються розчинні секреторні білки, лізосомальні гідролази, а також нерозчинні мембранні білки. Тут же здійснюється первинна модифікація цих молекул, сполучення їх із олігосахаридами (реакції глікозилювання) із утворенням глікопротеїнів. В ЕПР також здійснюється синтез і збирання ліпідів самих мембран, включаючи фосфоліпіди й холестерол

Апарат Гольджі – сукупність окремих мембран, що здійснює модифікацію і збереження білків, синтезованих на ЕПР, їхню упаковку та секрецію. Після модифікації в АГ синтезовані білки набувають функціональної активності. Деякі з них (зокрема, білки-транспортери, іонні канали, мембранні ферменти, рецептори) після процесингу в АГ прямують до ПМ і вбудовуватися в неї.

Агранулярний (гладенький) ЕПР здійснює біосинтез стероїдів (зокрема, статевих гормонів і стероїдних гормонів надниркових залоз), десатурацію жирних кислот, відіграє важливу роль у вуглеводному обміні (завдяки наявності ферменту глюкозо-6-фосфатфосфатази), відповідає за процеси детоксикації із залученням електронотранспортного ланцюга за участю цитохромів р450 і b5.

Пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) –
це вільнорадикальне окиснення
ненасичених жирних кислот, які входять до
складу фосфоліпідів клітинних мембран.

В реакції пероксидації крім ліпідів можуть
включатись сполуки різноманітного біохімічного
складу: ***білки, вуглеводи, нуклеїнові кислоти.***

Проте головне значення мають ***фосфоліпіди***. Це
визначається тим, що вони є основним
компонентом мембран і легко вступають в
оксигеназні реакції.

Пероксидне окиснення ліпідів

```
graph TD; A[Пероксидне окиснення ліпідів] --> B[Ферментативне]; A --> C[Неферментативне];
```

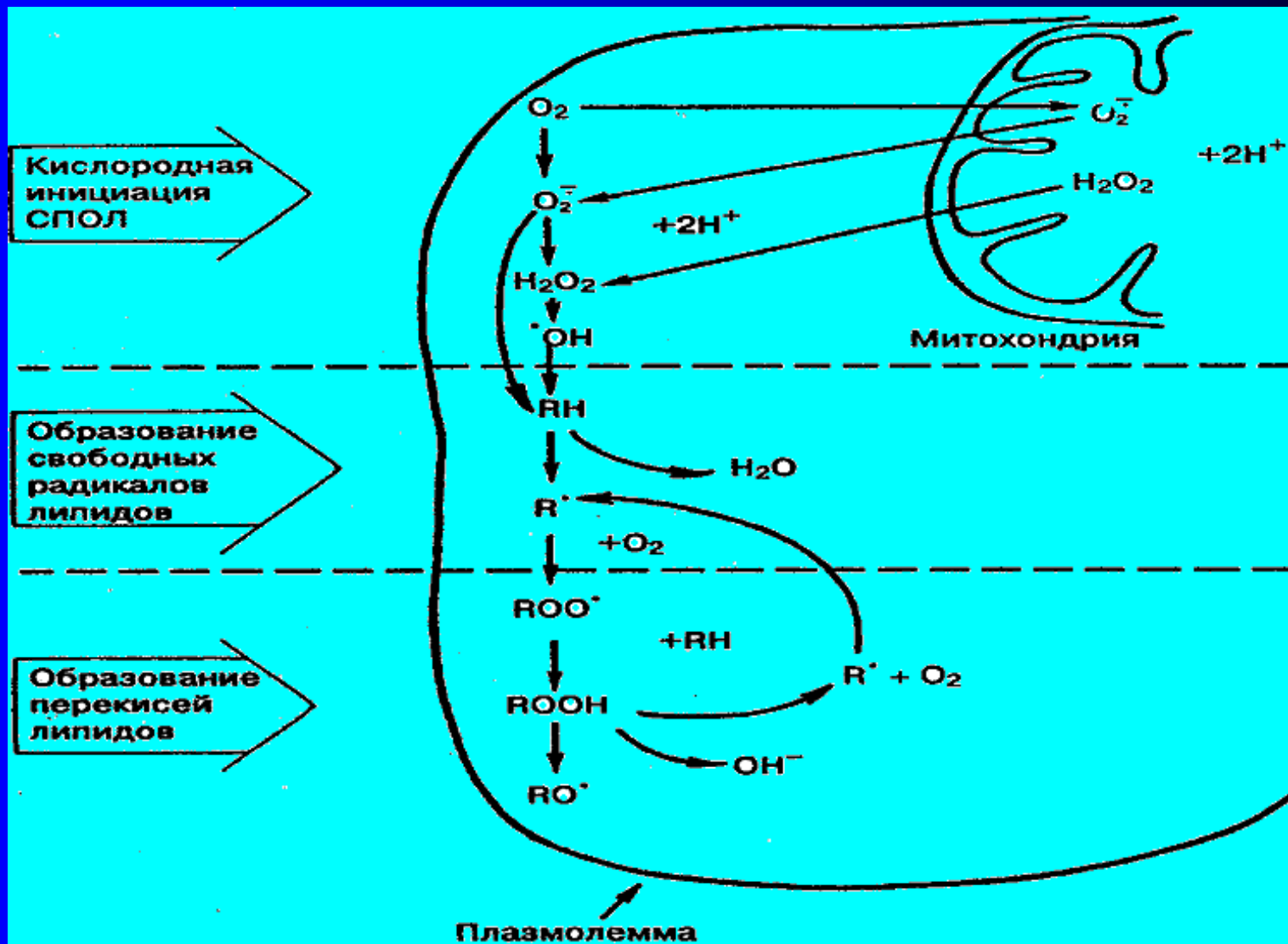
Ферментативне

- нормальний фізіологічний процес, що складає етап синтезу деяких метаболітів (простагландинів, лейкотрієнів, стероїдних гормонів)
- має досконалу регуляцію
- структурно впорядковане

Неферментативне

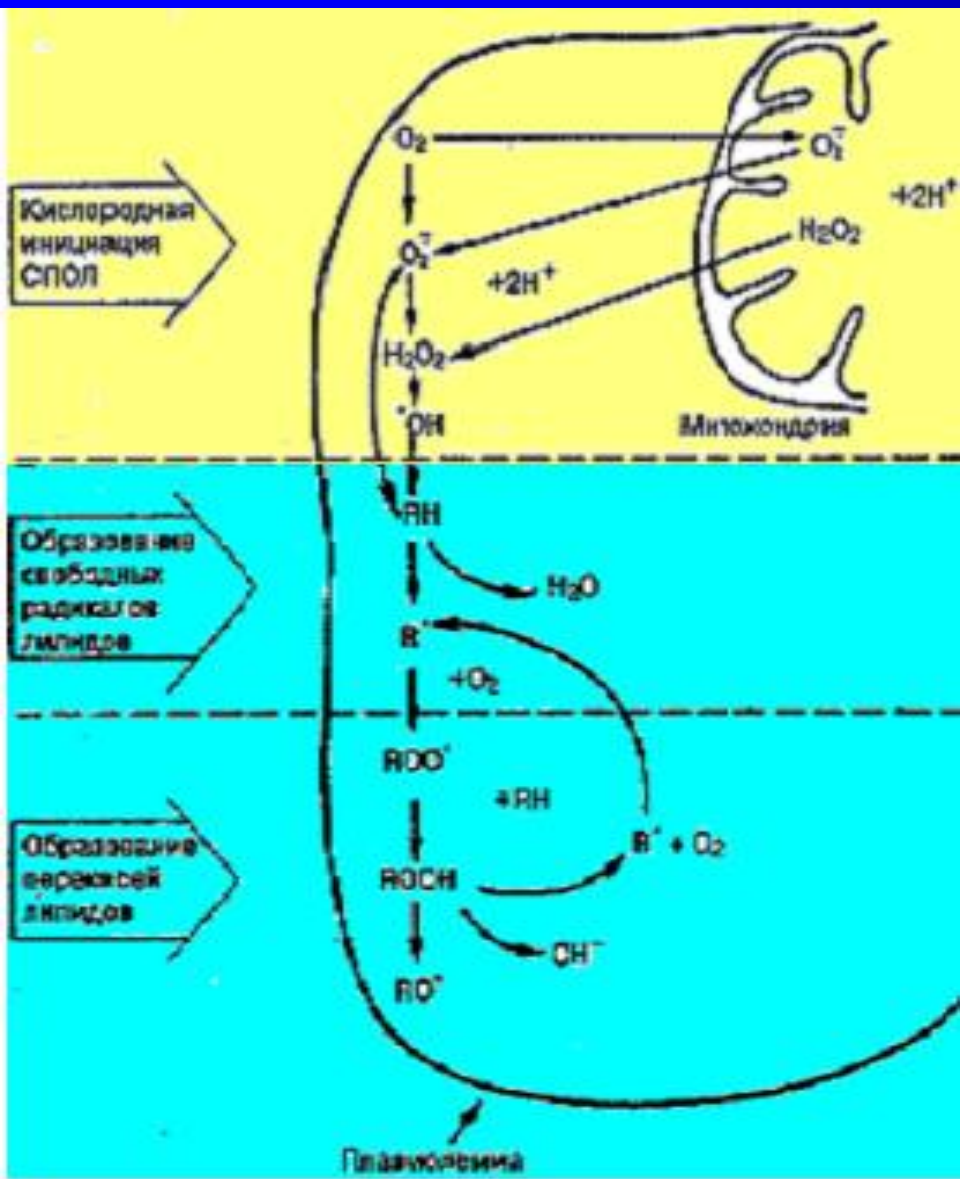
- структурно невпорядковане, може виникати у будь-якому компартменті клітини
- має ланцюговий і розгалуджений характер
- продукти агресивні і дуже токсичні

Етапи неферментативного ПОЛ



I етап ПОЛ – ІНІЦІАЦІЯ

Ініціальна ланка –
утворення **активних**
форм кисню (АФК)

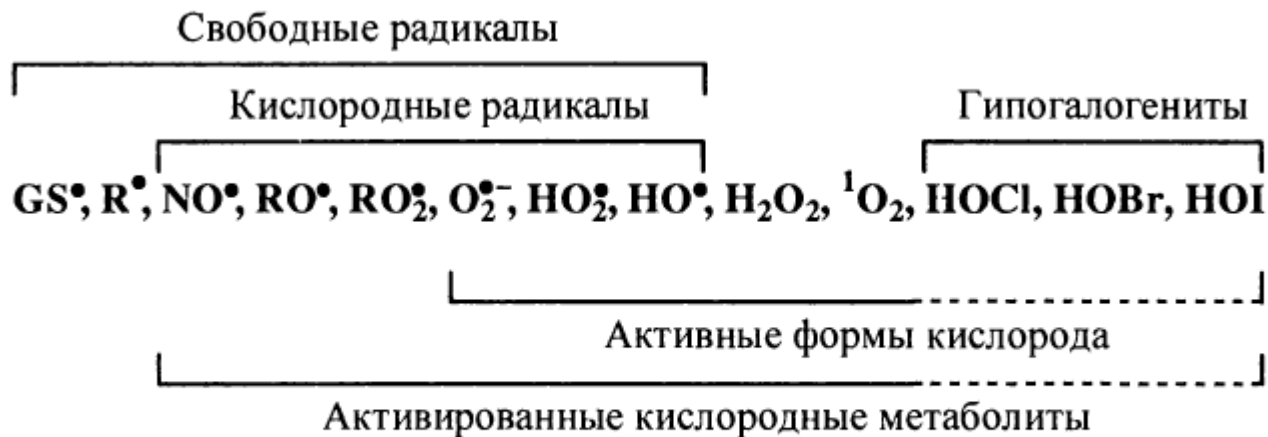


Активні форми кисню (АФК) – це продукти активації кисню, що мають здатність окиснювати органічні сполуки та біологічні полімери, які молекулярний кисень без участі специфічних ферментів окиснювати не здатен.

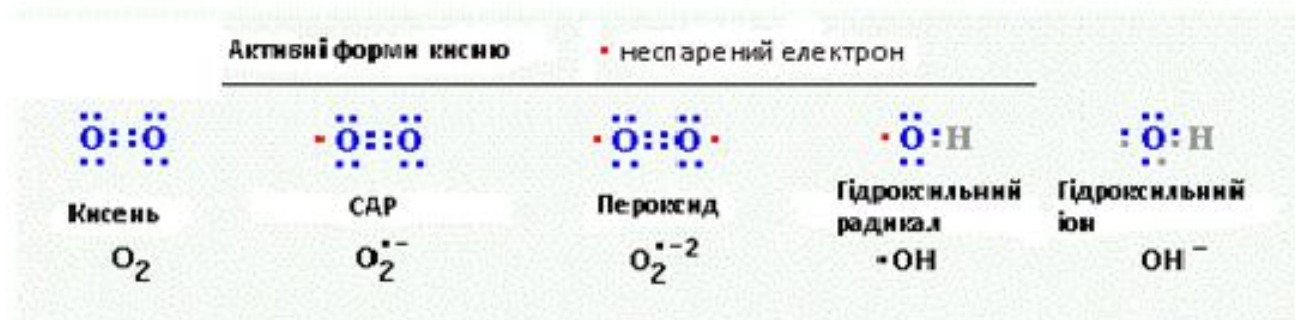
Поряд із АФК потужний окисдатовний потенціал мають *активні форми азоту*.

Активні форми азоту (АФА) – це продукти активації оксиду азоту (NO), що мають здатність окиснювати органічні сполуки та біологічні полімери, які оксид азоту без участі специфічних ферментів окиснювати не здатен.

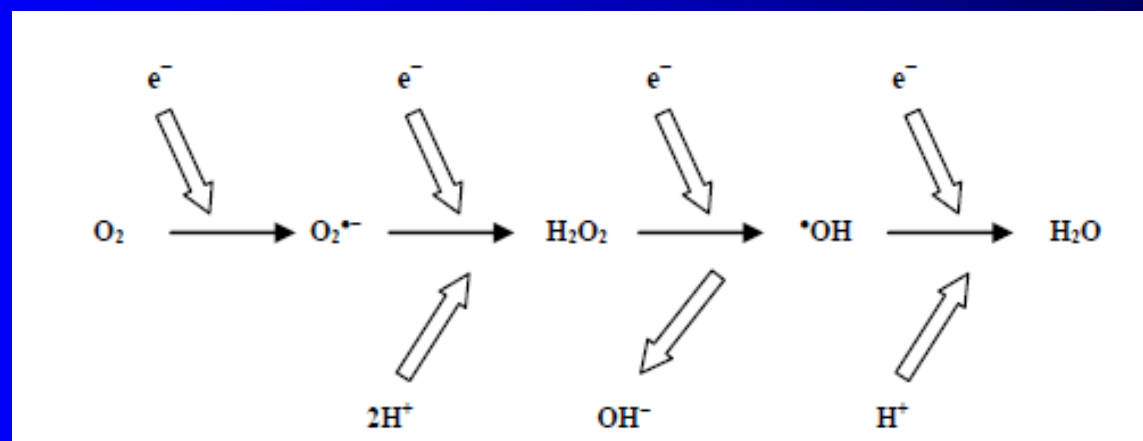
До **активных форм кислорода** относятся: супероксидный анион-радикал ($\bullet\text{O}_2^-$), його гідратовану форму ($\bullet\text{HO}_2^-$), синглетний кисень ($^1\text{O}_2$) та різні гіпогалагеніди (HOCl , HOBr та HOI). До **активных форм азоту** относятся: радикал оксиду азоту ($\text{NO}\bullet$), нітритний радикал ($\text{NO}_2\bullet$) та пероксинітрит (ONOO^-).



Активированные кислородные метаболиты, активные формы кислорода и радикалы



Схематичне зображення зовнішньої електронної хмари активних форм кисню.

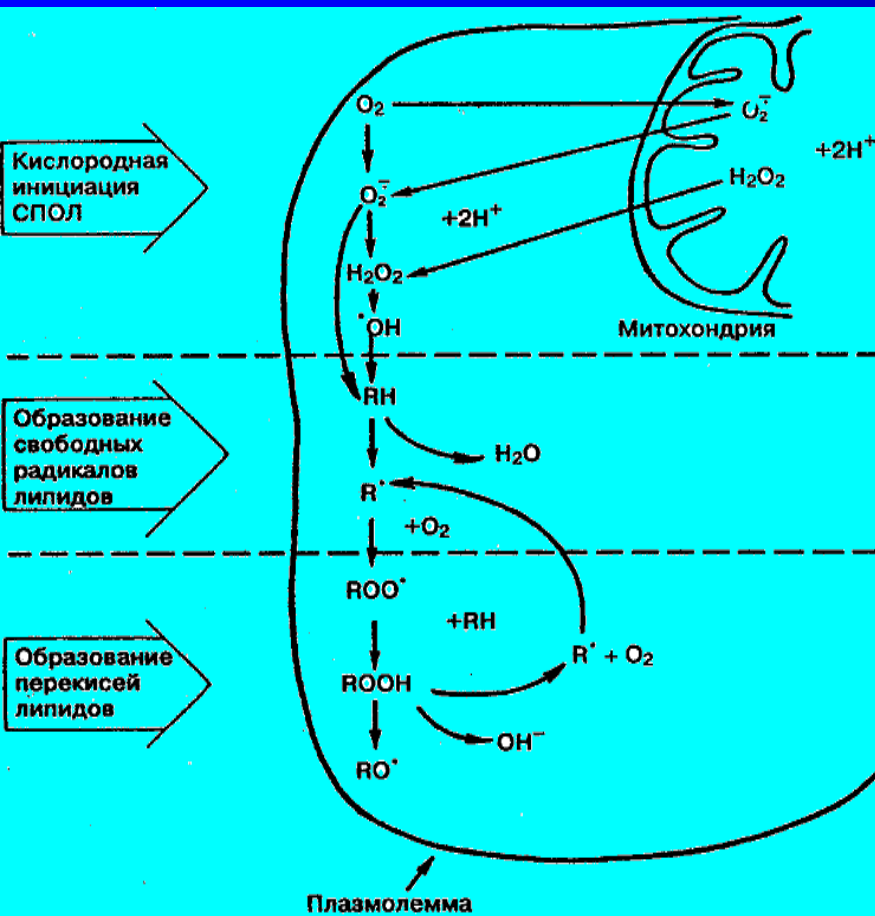


**Найважливіші характеристики
основних активних форм кисню**

Сполука	Хімічний символ	Період напіврозпаду при 37 °C, с	Властивості
Молекулярний кисень	O ₂	> 100	Слабкий окисник
Синглетний кисень	¹ O ₂	10 ⁻⁶	Сильний окисник
Супероксидний аніон	O ₂ ^{•-}	10 ⁻⁶	Швидко відновлюється; слабкий окисник
Гідроксильний радикал	HO•	10 ⁻⁹	Дуже активний у донорно-акцепторних реакціях, реакціях перенесення електронів; коротка відстань дифузії; є ініціатором ПОЛ у мембрані, також окиснює білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи
Гідропероксильний радикал	HOО•	10 ⁻⁸	Сильніший окисник і більш гідрофобна сполука, ніж O ₂ ^{•-} ; може ініціювати ПОЛ у мембрані
Пероксильний радикал	ROO•	10 ⁻²	Нижча окисдативна здатність у порівнянні з HO•, але вища швидкість дифузії
Алкоксильний радикал	RO•	10 ⁻⁶	Залучений у реакції ПОЛ
Пероксид водню	H ₂ O ₂	10–100	Окисданти із низькою швидкістю взаємодії з органічними субстратами; має вищу здатність до проникнення крізь мембрани

Название	Обозначение	Время жизни, с
Монооксид азота	NO	1–100
Диоксид азота	NO ₂	10 ⁻⁷ –10 ⁻⁸
Нитрозоний (нитрозильный катион)	NO ⁺	10 ⁻¹⁰
Нитроксил (нитроксильный анион)	NO ⁻	10 ⁻³
Пероксинитрит-ион	ONOO ⁻	0,05–1
Карбонатный анион-радикал	CO ₃ ⁻	10 ⁻⁷ –10 ⁻⁸
Монооксид углерода	CO	10

II етап ПОЛ – Утворення вільних радикалів ліпідів

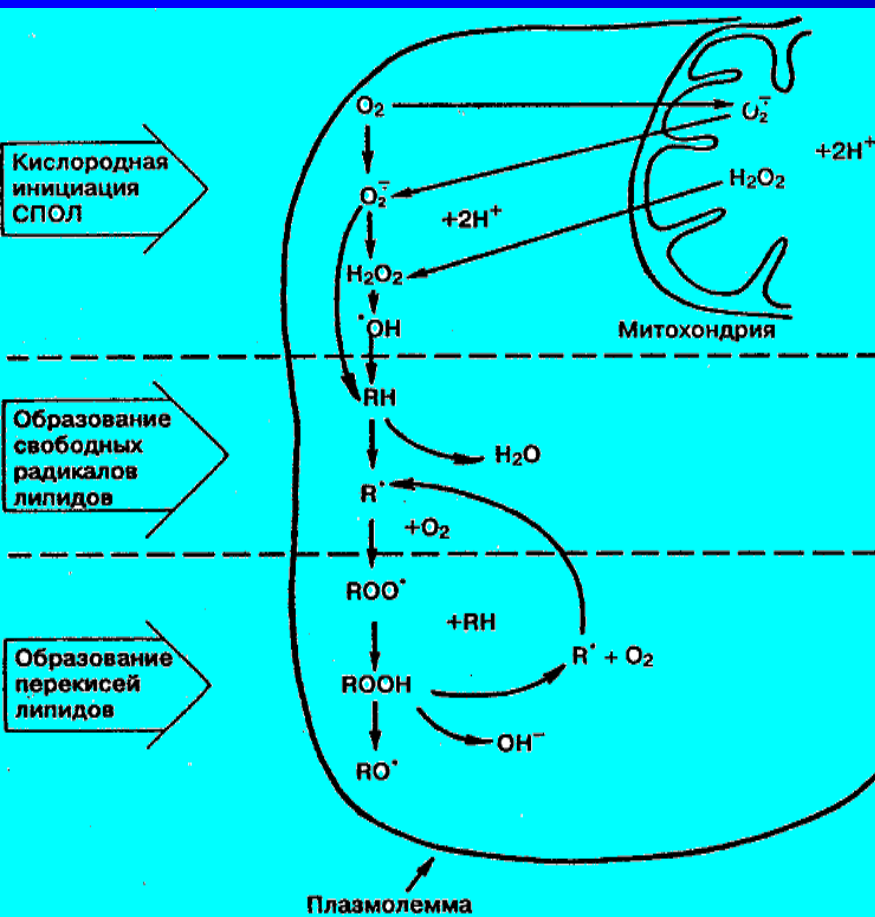


Ініціатором ПОЛ виступає $HO^{\cdot}$, який, будучи незарядженою малою часткою, вільно проникає у товщу гідрофобного ліпідного шару і вступає в хімічну взаємодію з поліненасиченими жирними кислотами у складі ліпідів (LH).

Безпосередніми мішенями гідроксильного радикала при цьому є метиленові містки ($-CH_2-$), що містять особливо реактивні атоми водню і розділяють у молекулах поліненасичених жирних кислот окремі подвійні зв'язки. При цьому в ліпідному бішарі утворюються ліпідні радикали ($L^{\cdot}$):



III етап ПОЛ – Утворення радикалів ліпопероксидів



$L^{\bullet}$ вступає в реакцію з розчиненим у водному середовищі молекулярним киснем – при цьому утворюється новий вільний радикал – *радикал ліпопероксиду* ($LOO^{\bullet}$):



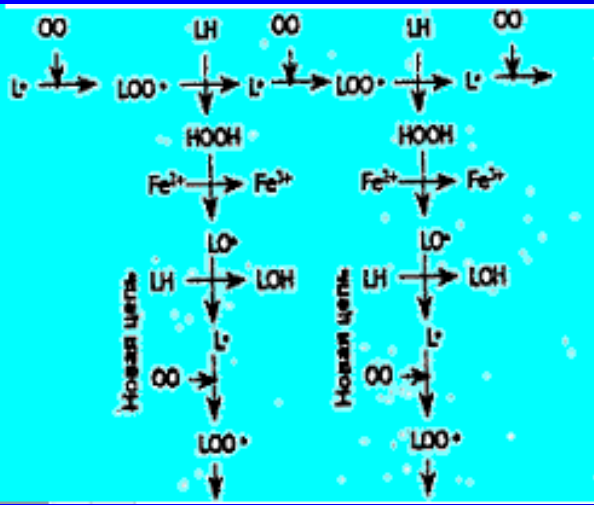


Продовження ланцюгової реакції полягає в тому, що радикал **LOO●** атакує одну із сусідніх молекул фосфоліпіду (**LH**) з утворенням *гідропероксиду ліпіду* (LOOH) та нового радикала **L●**:

$$\text{LOO}\bullet + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\bullet$$

Чергування двох останніх реакцій і є ланцюговою реакцією ПОЛ.

- **Ланцюговий характер** — під час реакцій ПОЛ не виникає знищення вільних радикалів і у процес включаються все нові й нові молекули ненасичених жирних кислот.



Розгалуження ланцюга потребує наявності невеликої кількості Fe^{2+} – тоді відбувається дихотомія ланцюгів через взаємодію Fe^{2+} із гідропероксидами ліпідів (*реакція Фентона*):



Утворені *алкоксильні радикали* $\text{LO}\bullet$ ініціюють нові ланцюги окиснення ліпідів:



➤ **Розгалуджений характер** – у наростаючій кількості з'являються вільні радикали, джерелом яких є самі проміжні продукти ПОЛ.

У біологічних мембранах ланцюги можуть мати понад 10 ланок. Але врешті-решт **ланцюг обривається** через взаємодію вільних радикалів з антиоксидантами (InH), іонами металів змінної валентності (наприклад, тими ж Fe^{2+}) або один з одним:



Продукти ПОЛ

Первинні

*дієнові
кон'югати*

Вторинні

*малоновий
диальдегід*

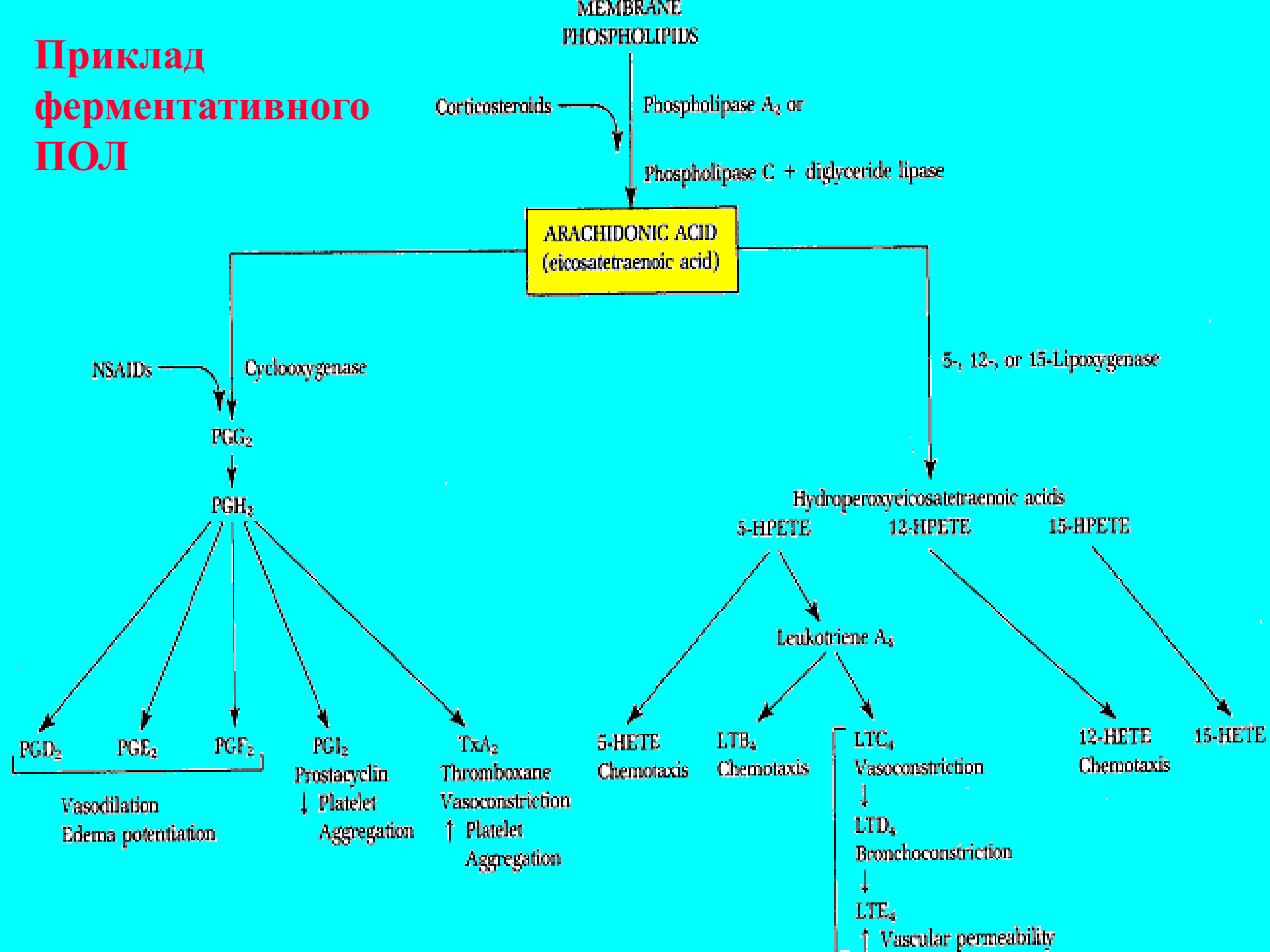
Кінцеві

*шифрові
основи, етан,
пентан*

**Особливості впливу процесів ПОЛ
на компоненти біологічних мембран**

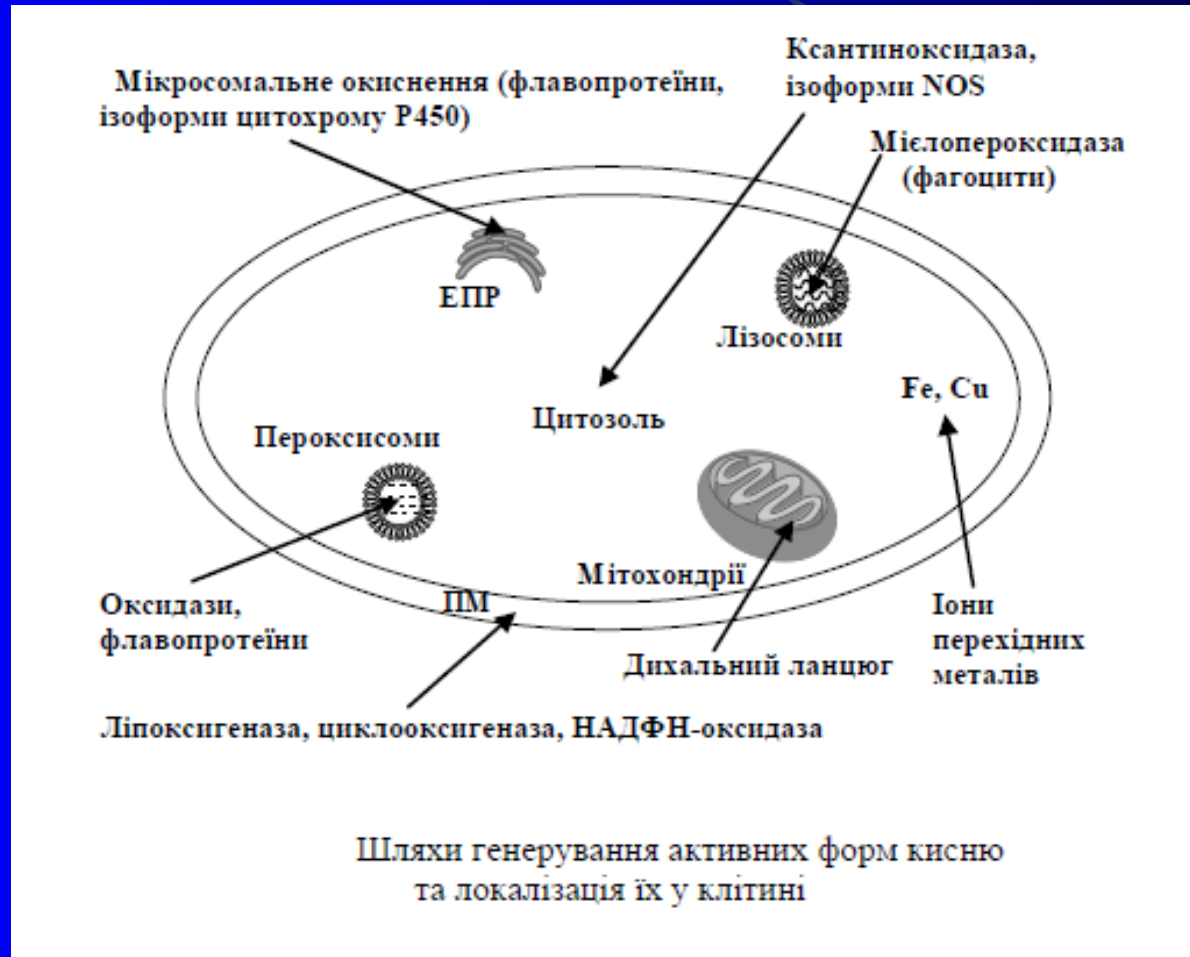
Дія ПОЛ на мембранні білки	Дія ПОЛ на ліпідний бішар
Окиснення SH-груп	Збільшення проникності для іонів H^+ , що стає причиною "енергетичного голоду" клітини
Ушкодження транспортних систем, у тому числі мембранних АТФаз	Збільшення мікров'язкості мембран
	Збільшення проникності для іонів Ca^{2+} , що впливають на внутрішньоклітинні сигнальні каскади
	Зміна проникності для іонів натрію, що спричиняє зміну поверхневого заряду мембран
	Зменшення гідрофобного об'єму
	Збільшення полярності ліпідної фази

Приклад ферментативного ПОЛ

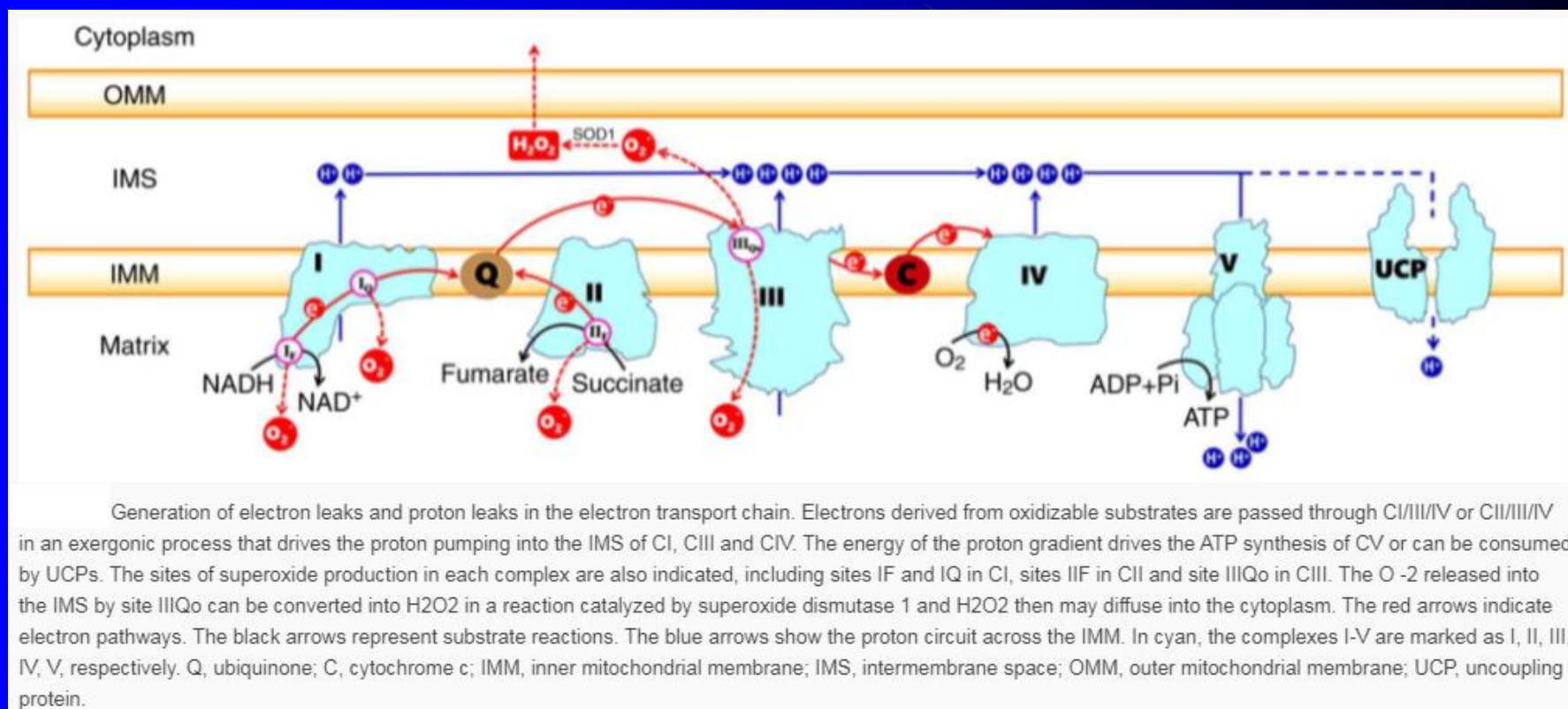


ДЖЕРЕЛА АФК

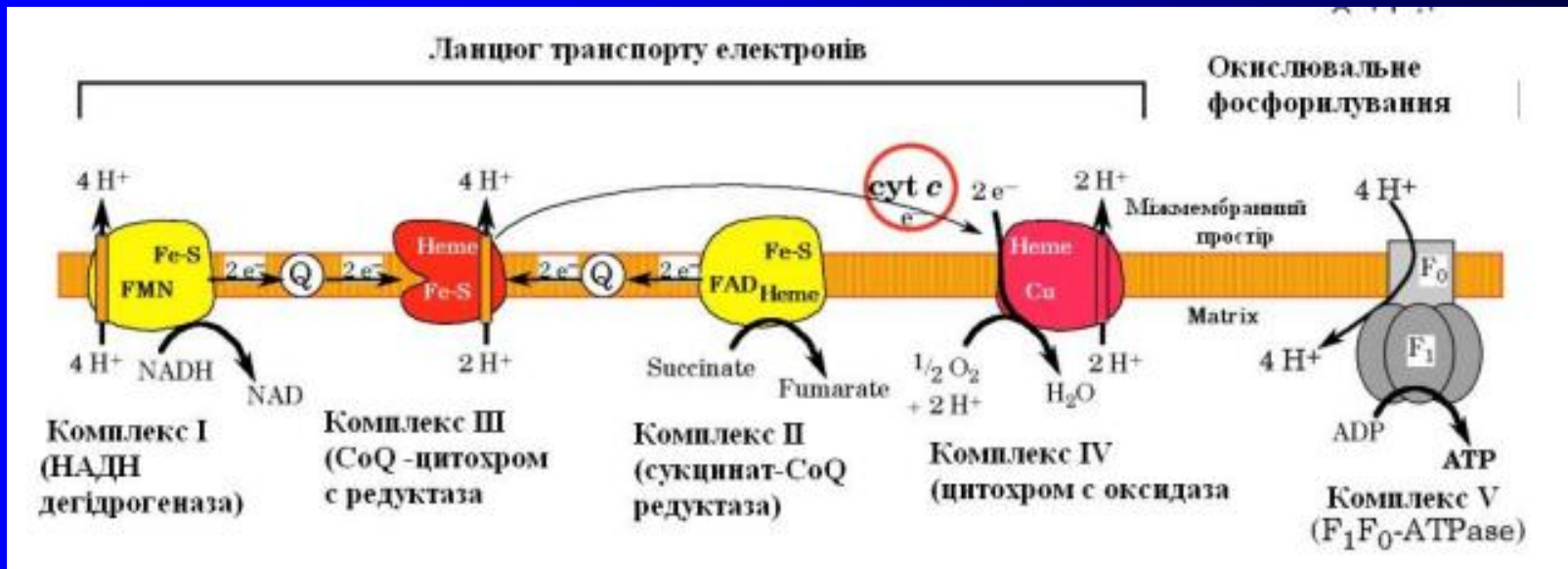
супероксидний аніон-радикал



Мітохондрії як джерело супероксидного аніон-радикала



Zhao RZ, Jiang S, Zhang L and Yu ZB: Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). Int J Mol Med 44: 3-15, 2019

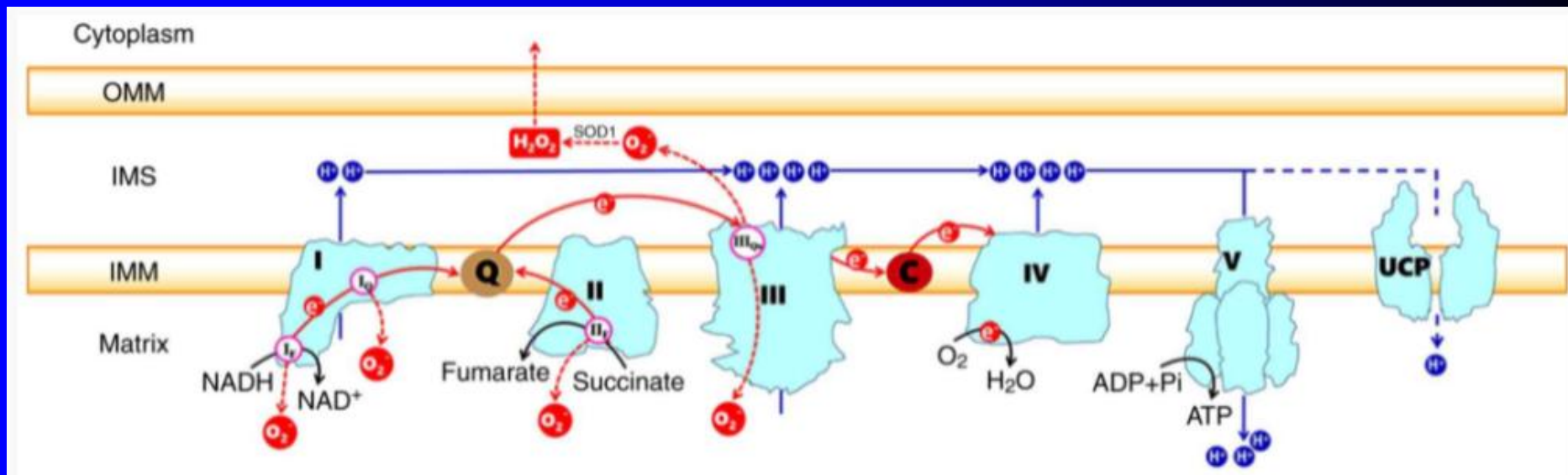


Комплекс I (НАДН-дегідрогеназний комплекс, НАДН-коензим Q-редуктаза) окиснює НАДН, відбираючи в нього два електрони та переносячи їх на розчинний в ліпідах убіхінон, який всередині мембрани дифундує до комплексу III. Водночас, комплекс I перекачує 2 протони та 2 електрони з матриксу в міжмембранний простір мітохондрії.

Комплекс II (сукцинатдегідрогеназа, сукцинат-коензим Q-редуктаза) не перекачує протони, але забезпечує вхід у ланцюг додаткових електронів завдяки окисненню сукцинату.

Комплекс III (цитохром-bc₁-комплекс, коензим Q-цитохром c-редуктаза або убіхінолдегідрогеназа) переносить електрони з убіхінону на два водорозчинних цитохроми c, розміщених на внутрішній мембрані мітохондрії. Убіхінон передає 2 електрони, а цитохроми за один цикл переносять по одному електрону. Водночас туди також переходять 2 протони убіхінону та перекачуються комплексом.

Комплекс IV (цитохром c оксидаза) каталізує перенесення 4 електронів з 4 молекул цитохрому на O₂ та перекачує водночас 4 протони в міжмембранний простір. Комплекс складається з цитохромів а й а₃, які, окрім гему, містять йони міді.



Generation of electron leaks and proton leaks in the electron transport chain. Electrons derived from oxidizable substrates are passed through CI/III/IV or CII/III/IV in an exergonic process that drives the proton pumping into the IMS of CI, CIII and CIV. The energy of the proton gradient drives the ATP synthesis of CV or can be consumed by UCPs. The sites of superoxide production in each complex are also indicated, including sites I_F and I_Q in CI, sites II_F in CII and site III_Q in CIII. The O_2^- released into the IMS by site III_Q can be converted into H_2O_2 in a reaction catalyzed by superoxide dismutase 1 and H_2O_2 then may diffuse into the cytoplasm. The red arrows indicate electron pathways. The black arrows represent substrate reactions. The blue arrows show the proton circuit across the IMM. In cyan, the complexes I-V are marked as I, II, III, IV, V, respectively. Q, ubiquinone; C, cytochrome c; IMM, inner mitochondrial membrane; IMS, intermembrane space; OMM, outer mitochondrial membrane; UCP, uncoupling protein.

Table

The pathologies in which the mitochondrial production of reactive oxygen species has been implicated.

Pathology	Representative references
Atherosclerosis	(105,106)
Hypertension	(107)
Ischemia-reperfusion injury	(86,108,109)
Cardiomyopathy	(110,111)
Pulmonary hypertension	(112,113)
COPD	(114-116)
Cancer	(117,118)
Diabetes	(119,120)
Non-alcoholic liver disease	(121,122)
Alzheimer's disease	(119,123)
Parkinson's disease	(124)
Schizophrenia	(125,126)
Hearing loss	(127,128)
Age-related macular degeneration	(129,130)
Obesity	(131)
HIV-1 infection	(132,133)
Duchenne muscular dystrophy	(134,135)
Periodontitis	(136)

[i] COPD, chronic pulmonary obstructive disorder; HIV, human immunodeficiency virus.

High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria

Sergey S. Korshunov, Vladimir P. Skulachev*, Anatoly A. Starkov

Department of Bioenergetics, A.N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow 119899, Russia

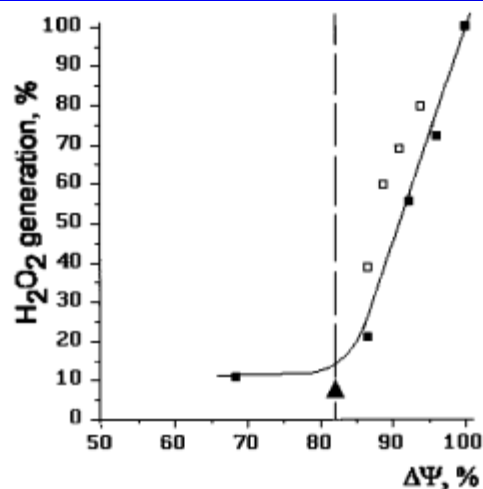


Fig. 4. H_2O_2 formation as a function of $\Delta\Psi$. Incubation mixture as in Fig. 3. The $\Delta\Psi$ level was varied by adding different concentrations of SF6847 (black squares and solid line), malonate (white squares) or 100 μ M ADP and 5 mM P_i (triangle). Dashed line, the state 3 $\Delta\Psi$ level.

Якщо протонів прокачується менше, кисень частіше отримує рівну кількість протонів і електронів, і вільні радикали виникають рідше.

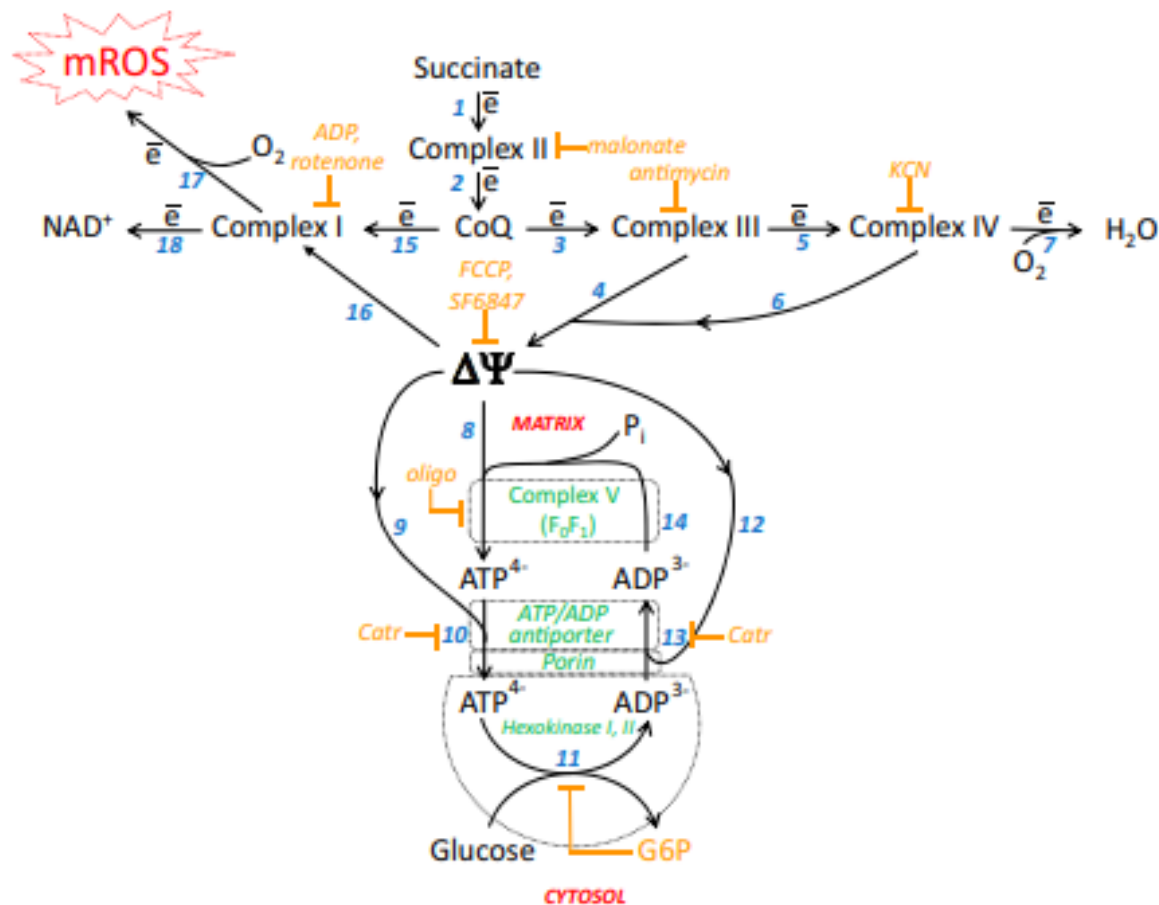
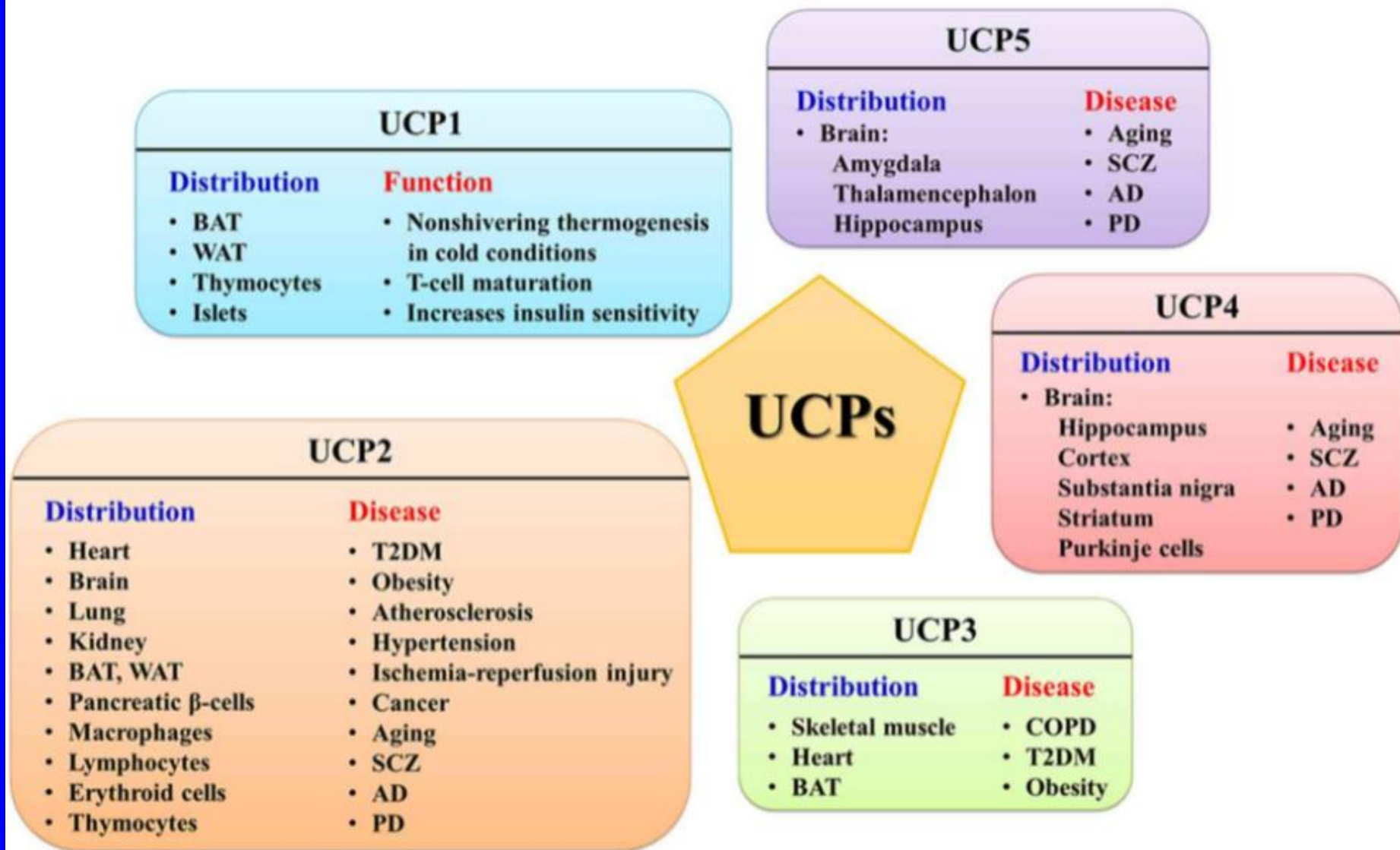


Fig. 1. Interrelations of respiratory chain Complexes I, II, III, and IV; H⁺-ATP-synthase (Complex V); ΔΨ; ATP/ADP-antiporter; porin; mitochondrion-bound hexokinase I or II; and mROS. Complex I, NADH-CoQ oxidoreductase; Complex II, succinate dehydrogenase; Complex III, CoQH₂-cytochrome c oxidoreductase; Complex IV, cytochrome c oxidase; P_i, inorganic phosphate; Catr, carboxyatractylate.



Distribution of mitochondrial UCP1-5 and their related diseases. BAT, brown adipose tissue; WAT, white adipose tissue; T2DM, type II diabetes; SCZ, schizophrenia; AD, Alzheimer's disease; PD, Parkinson's disease; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; UCP, uncoupling proteins.





Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program

Mikhail Y. Vyssokikh^a, Susanne Holtze^b, Olga A. Averina^{a,c}, Konstantin G. Lyamzaev^{a,c}, Alisa A. Panteleeva^a, Maria V. Marey^d, Roman A. Zinovkin^{a,c,e}, Fedor F. Severin^a, Maxim V. Skulachev^{a,c}, Nicolas Fasel^f, Thomas B. Hildebrandt^b, and Vladimir P. Skulachev^{a,1}

^aBelozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; ^bDepartment of Reproduction Management, Leibniz Institute for Zoo and Wildlife Research, 10315 Berlin, Germany; ^cInstitute of Mitoengineering, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; ^dResearch Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, 117198 Moscow, Russia; ^eInstitute of Molecular Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University, 119991 Moscow, Russia; and ^fDepartment of Ecology and Evolution, University of Lausanne, 1015 Lausanne, Switzerland

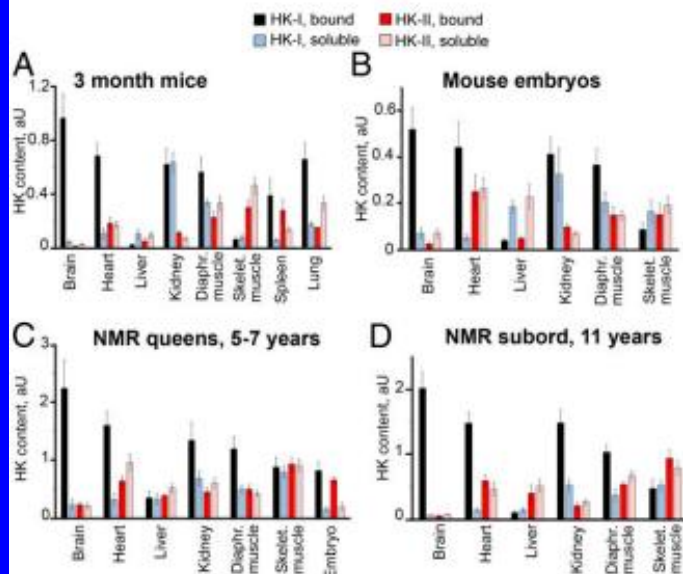


Fig. 2. Contents of mitochondria-bound and soluble hexokinases (HK) I and II in different tissues from mice and NMRs. Western blot analyses were performed with the appropriate monoclonal antibodies. Mean values for three to four repeats are presented. (A) 3-mo-old mice ($n = 7$). (B) Mouse embryos ($n = 21$). (C) NMR queens ($n = 5$). (D) NMR subordinates ($n = 3$).

Чим корисно падіння різниці потенціалів на внутрішній мембрані мітохондрій та чим це забезпечується?



- Якщо протонів прокачується менше, кисень частіше отримує рівну кількість протонів і електронів, і вільні радикали виникають рідше.
- Щоб знизити різницю потенціалів, клітини використовують фермент гексокіназу. Вона ловить новостворену АТФ і розщеплює її, навішуючи фосфатну групу, що звільнилася, на молекулу глюкози.
- Таким чином, гексокіназа тут же витрачає енергію, яку клітина тільки що запасла, і виходить, що протони були витрачені даремно.
- Якщо фермент працює постійно, то іони водню виявляються в дефіциті, і різниця потенціалів на мембранах знижується.

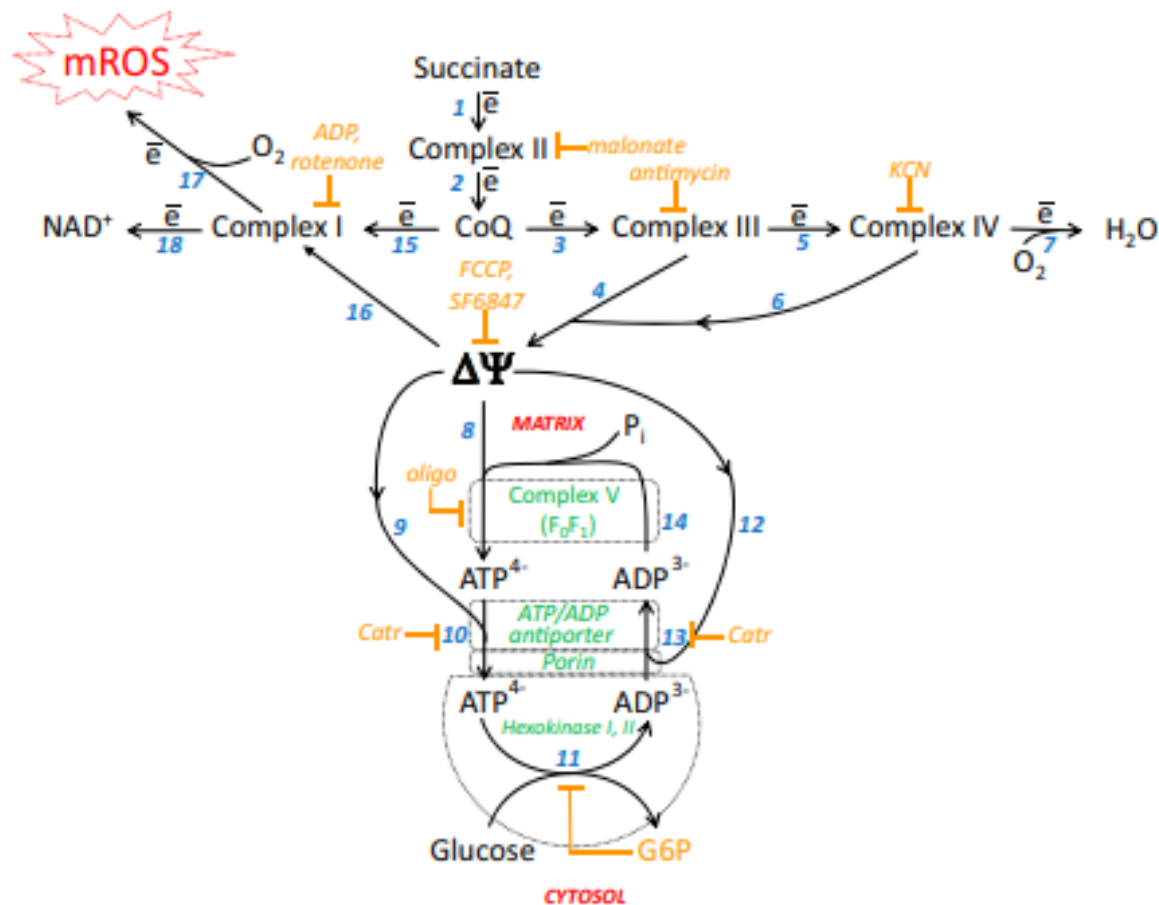


Fig. 1. Interrelations of respiratory chain Complexes I, II, III, and IV; H⁺-ATP-synthase (Complex V); ΔΨ; ATP/ADP-antiporter; porin; mitochondrion-bound hexokinase I or II; and mROS. Complex I, NADH-CoQ oxidoreductase; Complex II, succinate dehydrogenase; Complex III, CoQH₂-cytochrome c oxidoreductase; Complex IV, cytochrome c oxidase; P_i, inorganic phosphate; Catr, carboxyatractylate.

The Naked Mole Rat: A Unique Example of Positive Oxidative Stress

Table 1

Potential positive effects of ROS in naked mole rats.

	Type of ROS	Gene/mechanisms	Naked mole rat	Ref.
Cellular homeostasis	H ₂ O ₂ [75]	<i>Nrf2</i>	Fibroblasts: Nrf2 ↗ Liver: Nrf2 ↗	[80–82]
	H ₂ O ₂ [77]	<i>p53</i>	Fibroblasts: p53 ↗ Liver: p53 ↗	[80, 83]
	H ₂ O ₂ [84]	<i>PTEN</i>	17 copies of <i>PTEN</i> pseudogenes	[85]
Immune system	O ₂ ^{•−} /H ₂ O ₂ [90]	Oxidative burst	Macrophages ↗	[89]
Thermal regulation	O ₂ ^{•−} /H ₂ O ₂ [96]	Hypothermia	Low body temperature 30–33°C	[91]

Review Article

The Naked Mole Rat: A Unique Example of Positive Oxidative Stress

Frédéric Saldmann,^{1,2} Melanie Viltard ,¹ Christine Leroy,^{3,4} and Gérard Friedlander^{2,3,4}

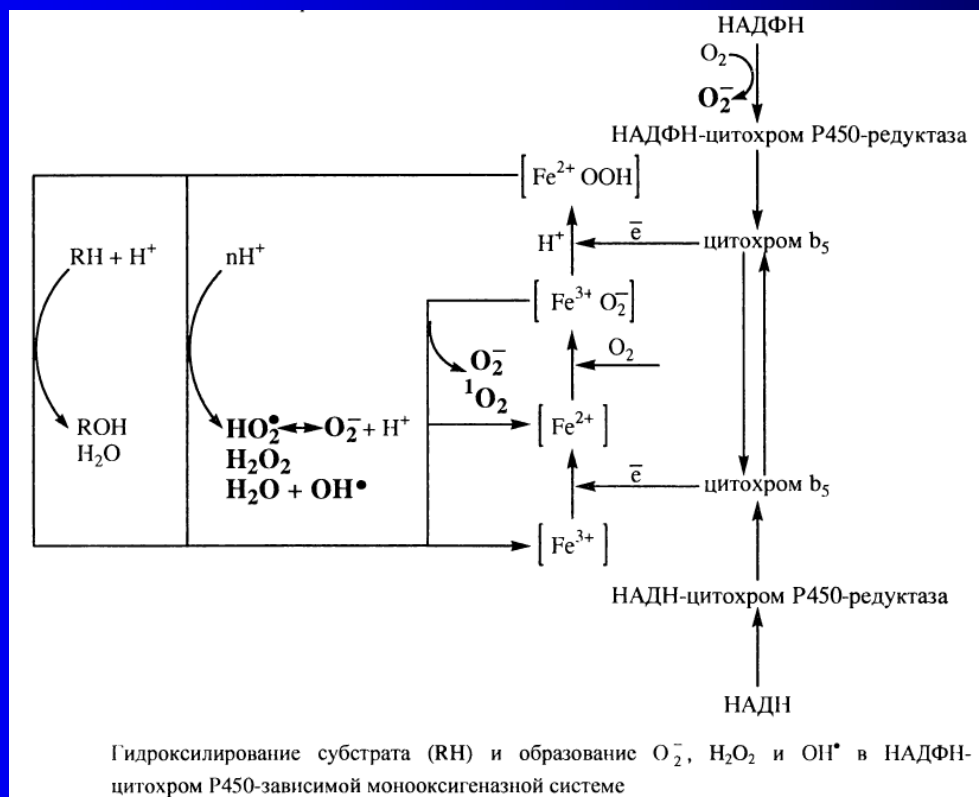
¹Fondation pour la Recherche en Physiologie, Brussels, Belgium

²Service de Physiologie et Explorations Fonctionnelles, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

³Université Paris Descartes, Faculté de Médecine, Paris, France

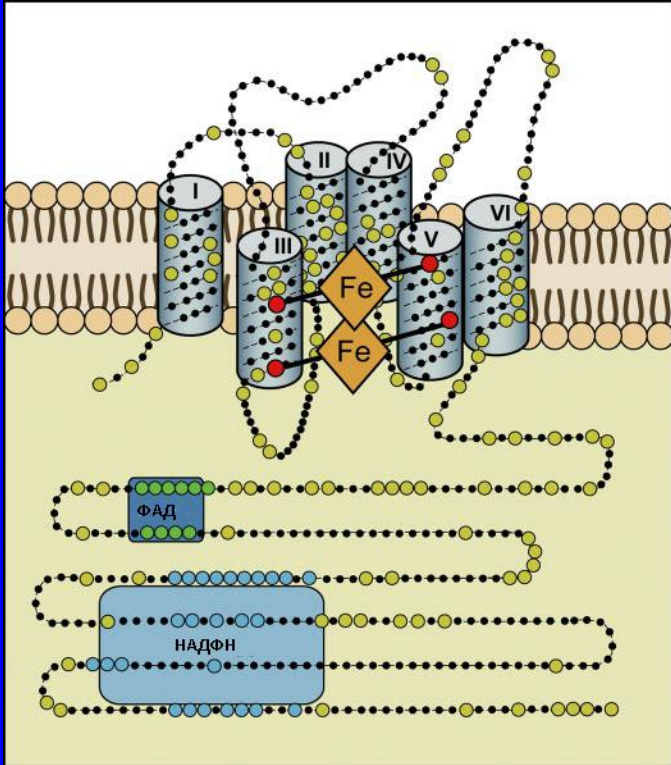
⁴INSERM UMR_S1151 CNRS UMR8253 Institut Necker-Enfants Malades (INEM), Paris, France

Мікросомальні монооксигенази як джерело супероксидного аніон-радикала



- O_2^- починає формуватися за умов активації цитохром Р450 певним субстратом (ксенобіотиком, токсином), наявності надлишку електронів (у вигляді великої концентрації НАДФН₂) та вичерпанням субстрату після кількох циклів оксидації. Це створює умови за яких цитохром Р450 буде продовжувати використовувати НАДФН₂ для формування оксидативного комплексу.

НАДФН-оксидази як джерело супероксидного аніон-радикала



Типова структура ізоформ
НАДФН-оксидази

НАДФН-оксидаза належить до групи гомологічних трансмембранних ферментів які переносять електрони крізь клітинну мембрану. Всі НАДФН-оксидази мають центр приєднання НАДФН, центр приєднання ФАД, шість трансмембранних доменів та 4 гем-вмісних домени, по два домени у третьому та п'ятому трансмембранному домені

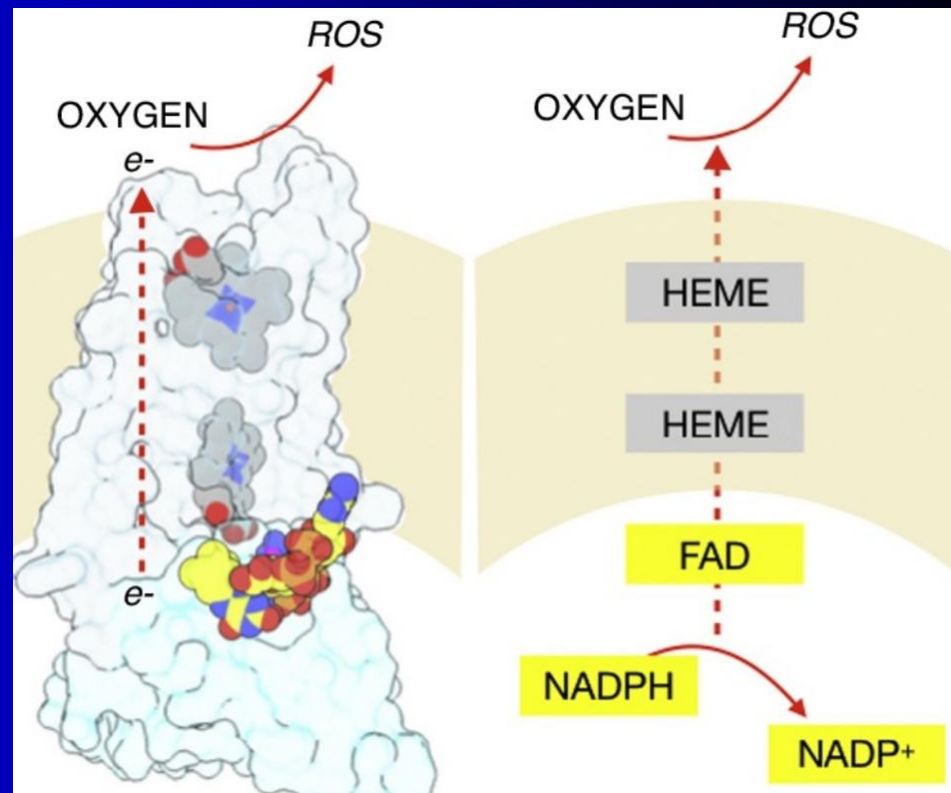
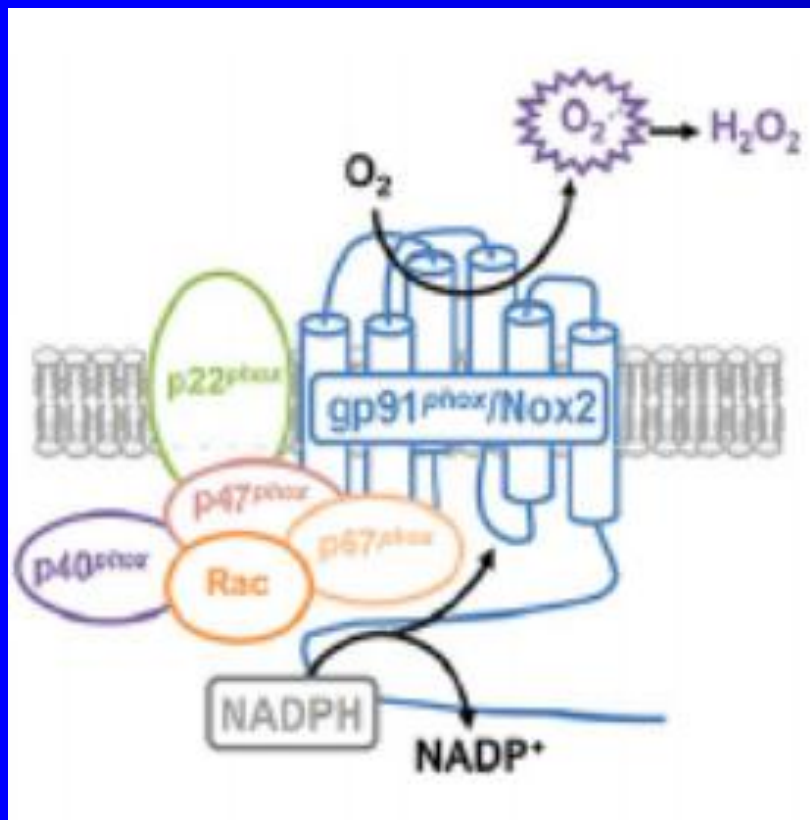
Expression of NOX family members and their components in various tissues or cells

NOX type/component		Expression observed in	
		Tissue	Cells
NOX isoforms			
1	NOX1	Colon and vascular smooth muscle, prostate, uterus ⁷⁹ Colon epithelia ¹²⁵ Uterus and placenta ⁵⁹ Rectum ⁶⁰	Endothelial cells ⁷⁹ Osteoclasts ⁷⁹ Retinal pericytes, neurons, astrocytes and microglia ²⁷²
2	NOX2 (gp91 ^{phox})		Phagocytes/granulocytes—induced through bacterial LPS ¹⁶⁵ Human umbilical vein endothelial cells ¹⁶⁶ Coronary microvascular endothelial cells ¹⁶⁸ Cardiomyocytes ¹⁷⁹ CNS, endothelium, VSMCs, fibroblasts, skeletal muscle, hepatocytes and hematopoietic stem cells ¹⁸⁰
3	NOX3	Fetal kidney ⁷⁹ Liver, lung and spleen. Low levels in the adult colon and kidney ²⁷³ Inner ear ¹²⁷	
4	NOX4	Kidney ¹²⁸ Liver ¹²⁹ Ovary and eye ⁹⁵	Mesangial cells ¹²⁵ Smooth muscle cells ⁷⁹ Fibroblasts ¹⁸² Keratinocytes ¹⁸⁰ Osteoclasts ^{180,274} Endothelial cells ⁴⁰ Neurons ¹⁵⁹ Hepatocytes ¹⁷⁰ VSMCs ²⁷⁶
5	NOX5	Spleen, testis, mammary glands and cerebrum ⁷⁹ Fetal brain, heart, kidney, liver, lung, skeletal muscle, spleen, thymus ²³⁹ Prostate ¹⁶⁹ Lymphatic tissue, endothelial cells ²⁷⁵	
6	Duox1	Thyroid, cerebellum and lungs ¹³⁹ Ileum, cecum, and floating colon ¹⁴⁶ Respiratory tract epithelium ²⁷⁸	Thyroid cells ⁷⁹
7	Duox2	Colon pancreatic islets and prostate ²⁷⁹ Stomach, duodenum, ileum, jejunum, cecum, sigmoidal colon, floating colon and rectum ²⁸⁰ Pancreas ²⁸¹ Tracheal and bronchial epithelium ²⁸² Thyroid ²⁸³	Thyroid cells in primary culture ⁹⁰
Components of NOX			
1	p67 ^{phox} (NCF-2)	Kidney ²⁸⁴	Neutrophils ^{37,38}
2	p47 ^{phox} (NCF-1)		Neutrophils ²⁸⁵
3	p40 ^{phox} (NCF-4)		Mononuclear cells ²⁸⁶
4	p22 ^{phox}	Human coronary arteries ²⁰⁸	
5	RAC1 (p21)		Neutrophils ²⁸⁷
6	RAC2		Hematopoietic cells ²⁸⁸
7	NOX01, NOXA1	Colon ⁷⁹	

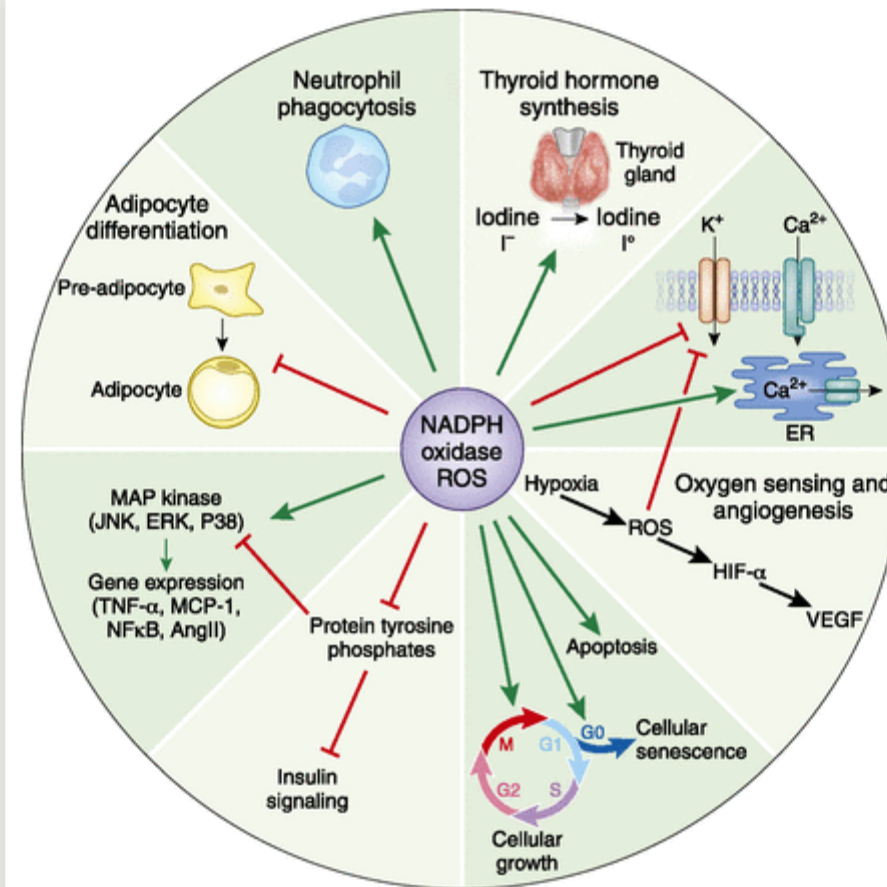
Abbreviations: NOX, NADPH oxidase; VSMC, vascular smooth muscle cell.

NADPH oxidase 2 (Nox2)
= cytochrome b(558) subunit
beta
= cytochrome b-245 heavy
chain

Chen S, Meng XF, Zhang C. Role of NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species in podocyte injury. Biomed Res Int. 2013;2013:839761.



Фагоцитарну НАДФН-оксидазу (*Nox2*, *phagocyte oxidase*, *Phox*) можна розглядати як трансмембранний електронно-транспортний ланцюг, що з'єднує донора електронів у вигляді НАДФН на цитозольній стороні мембрани з акцептором електронів – киснем на зовнішній стороні мембрани. Результатом такого переносу електрону є утворення $\bullet\text{O}_2^-$ на зовнішній поверхні мембрани.



Physiologic role of NADPH oxidase-derived ROS. Green arrows indicate activation, and red lines with blunted ends indicate inhibition. NoxS, renal NADPH oxidases; VEGF, vascular endothelial growth factor; HIF, hypoxia inducible factor; ER, endoplasmic reticulum; MCP-1, monocyte chemotactic protein-1; MAP kinase, mitogen activated protein kinase; JNK, c-Jun N-terminal kinase 1; ERK, extracellular signal-regulated kinases; P38, p38 kinase.

Mona Sedeek, Rania Nasrallah, Rhian M. Touyz, Richard L. Hébert
NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and the Kidney: Friend
and Foe. JASN Oct 2013, 24 (10) 1512-1518.

Ксантиноксидаза як джерело супероксидного аніон-радикала

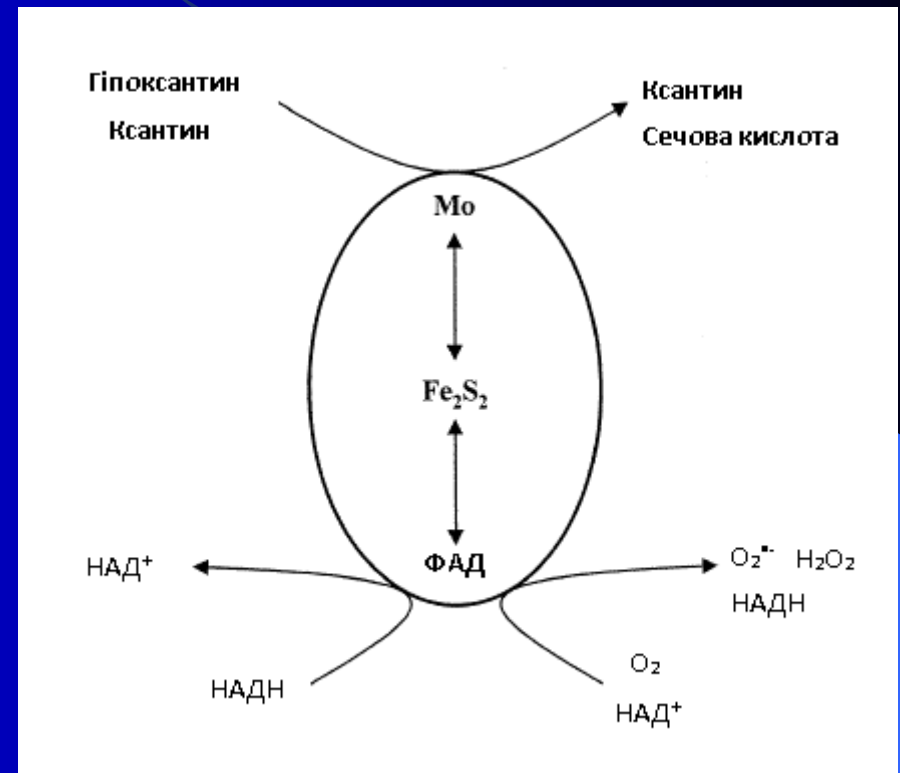
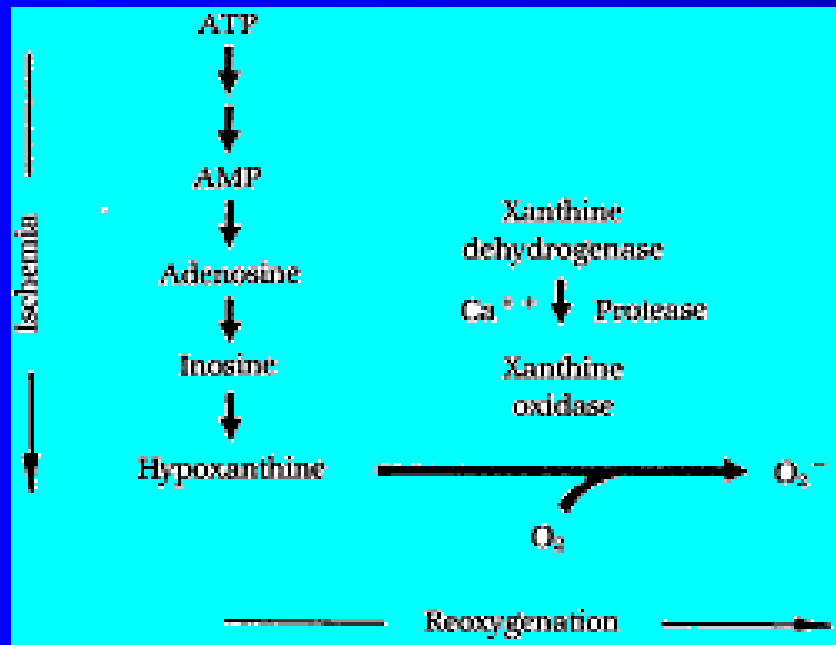
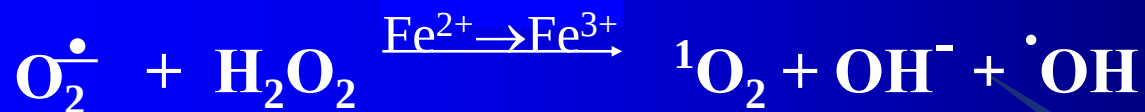


Схема продукції супероксидного аніон-радикала при окисненні ксантину та гіпоксантину ксантиноксидазою

Синглетний кисень у клітинах утворюється:

1) у реакції Габера-Вейса



2) під час спонтанної дисмутації супероксиду



3) під час фотосенсибілізації

Гідроксильний радикал у клітинах утворюється:

1) у реакції Габера-Вейса (взаємодія з пероксидом водню)

2) у реакції Фентона (у присутності перехідних металів)

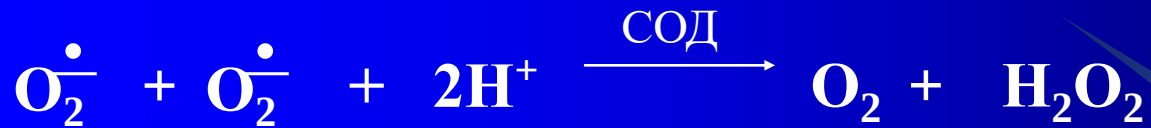


3) під час радіолізу води



Пероксид водню у клітинах утворюється:

1) у супероксиддисмутазній реакції

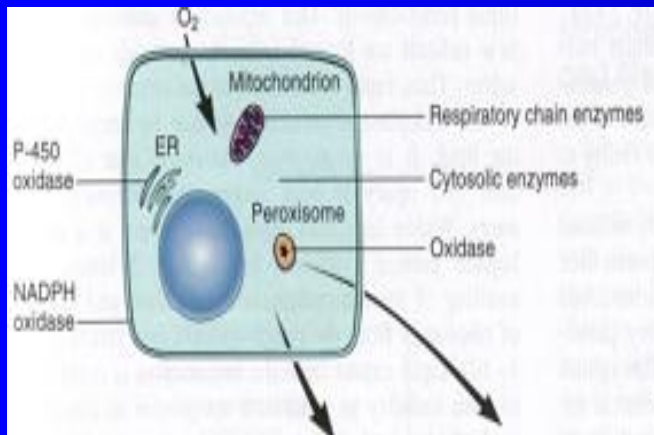


2) під час спонтанної дисмутації супероксиду



3) у системі ксантин-ксантиноксидаза

4) у реакції флавінових оксидаз



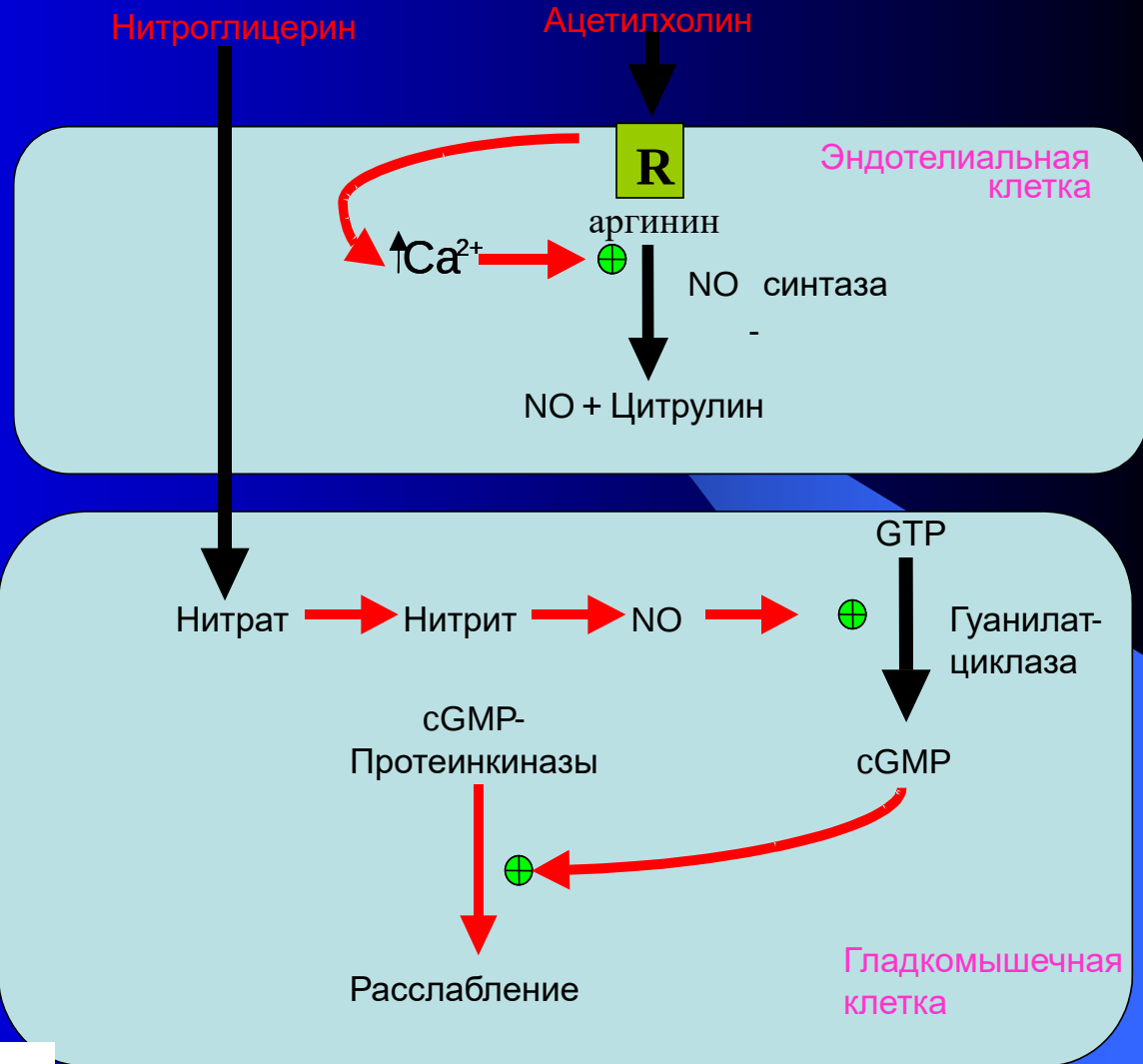
ДЖЕРЕЛА АФА оксид азоту (NO)

□ NO-синтазний шлях

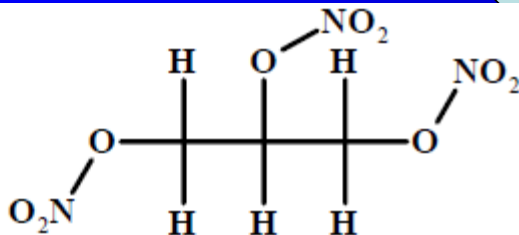
- нейрональна NO-синтаза
- ендотеліальна NO-синтаза
- індукцйбельна NO-синтаза

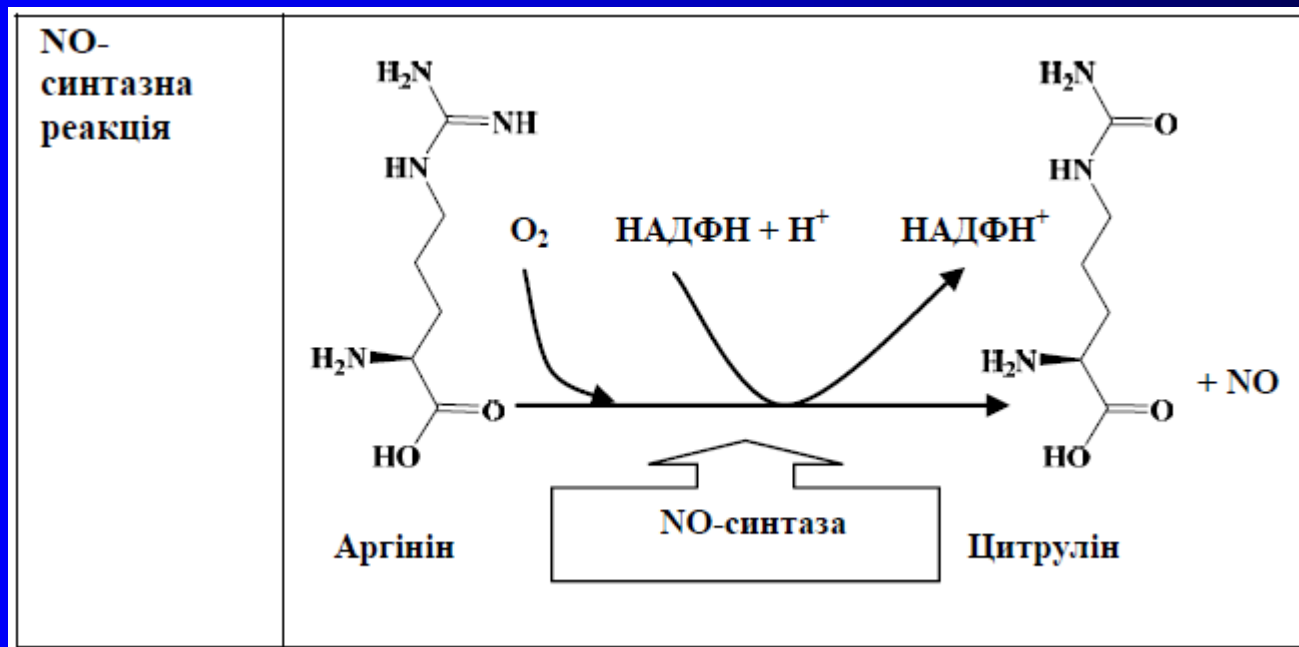
□ нітритредуктазний шлях (при взаємодії нітрит-іонів)

- з дезоксигемоглобіном
- з міоглобіном
- з цитохромами

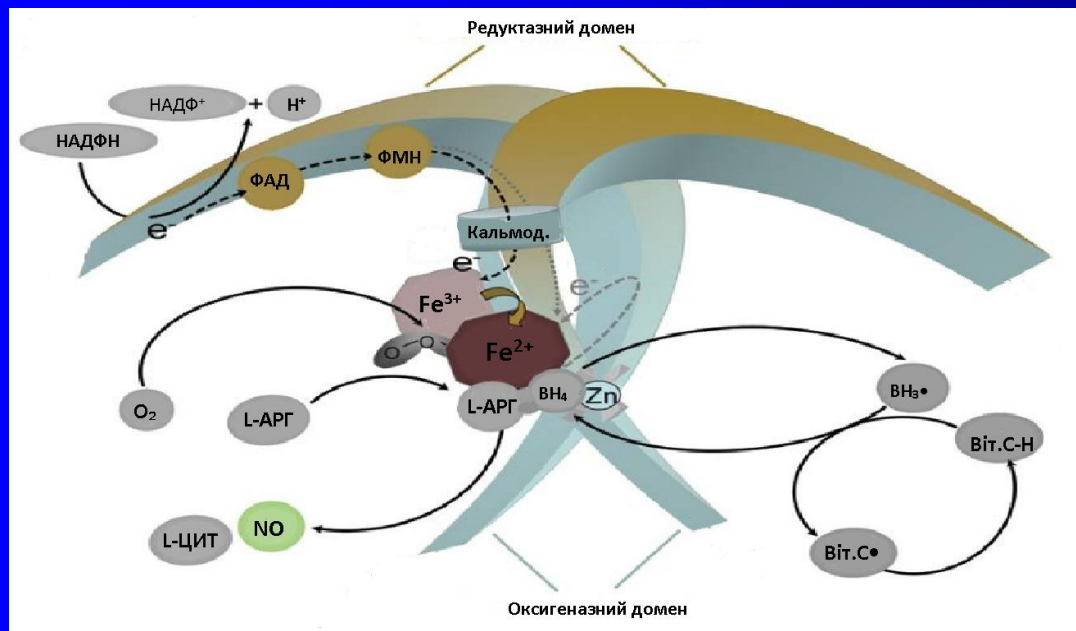


Структура
нітроглице-
рину

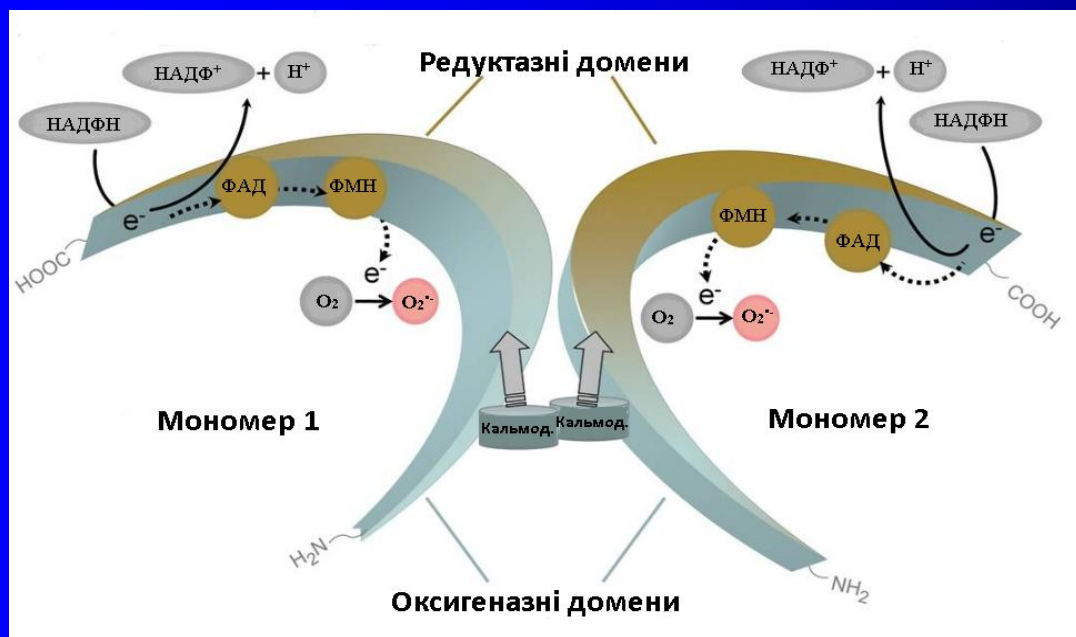




Ферментативний синтез NO та стимуляція монооксидом азоту та його донорами утворення цГМФ. Схема синтезу активатора розчинної гуанілатциклази –оксиду азоту – за участю NO-синтази



Продукція оксиду азоту NO-синтазою



Структура мономерів NO-синтази в розрізі можливості продукції супероксидного аніон-радикала

**Характеристики
різних ізоформ NOS**

	nNOS	eNOS	iNOS
Тканнна експресія	Постсинаптичні терміналі нейронів центральної та периферійної нервової системи; активується за дії глутамату або при деполяризації ПМ унаслідок відкриття потенціалзалежних Ca^{2+} -каналів	Ендотеліальні клітини судин	Макрофаги (основний індуктор – LPS клітинної стінки грамнегативних бактерій, який діє через Toll-подібні рецептори (підпідрозд. 11.2.1.1) і активацію транскрипційних факторів IRF-1 і NF- κ B. Інші клітини – нейтрофіли, гладком'язові клітини, хондроцити, гепатоцити, гліальні клітини нервової системи
М.м. субодиниці	160 кД	130 кД	130 кД
Структура	PDZ-домен на N-кінці молекули (рис. 5.6) сприяє зв'язуванню nNOS із рецепторами ПМ і білками цитоскелета	На N-кінці має 3 сайти для приєднання мірстинової та пальмітинової кислот (рис. 5.6), необхідних для сполучення ферменту з ПМ	–
Тип	Конститутивна	Конститутивна	Індуктибельна; індуктори – ендотоксини бактеріального походження, зокрема LPS
Локалізація	Цитозольна (розчинна), може приєднуватися до цитоскелета через PDZ-домен	Зв'язана з кавеолами ПМ через залишки жирних кислот	Цитозольна (розчинна)

	nNOS	eNOS	iNOS
Залежність від Ca^{2+}	Ca^{2+} -залежна	Ca^{2+} -залежна	Ca^{2+} -незалежна, оскільки сама є зв'язаною з кальмодуліном, і зміни внутрішньоклітинного вмісту Ca^{2+} на неї не впливають, а активність визначається головним чином швидкістю синтезу молекул ферменту; за відсутності KM iNOS є нестабільною
Рівні продукції NO	Невелика кількість (близько 5 Mm)	Невелика кількість (близько 1 Mm)	Збільшує кількість утворення NO більш ніж у 1000 разів
Основні функції	Є нейромедіатором, що залучається у процеси запам'ятовування, синаптичну пластичність, утворення синапсів, розвиток ексайтотоксичності (підпідрозд. 5.2.3.3, підрозд. 5.4), спричиненої надмірною активацією глутаматом NMDA-рецептора	Дифундуючи у клітини гладеньких м'язів кровоносних судин, спричиняє цГМФ-залежну релаксацію гладенької мускулатури, тим самим знижуючи кров'яний тиск і прискорюючи кровотік; причетна до розвитку атеросклеротичних ушкоджень	Реалізує бактерицидну та антипухлинну дії макрофагів, макрофаг-опосередковану цитотоксичність, зокрема за рахунок взаємодії iNOS-генерованого NO із супероксидним аніоном з утворенням пероксинітриду. Надмірна активація iNOS і генерація великих кількостей NO асоціюються із цитокін-індукованим септичним шоком: бактерії продукують ендотоксини (наприклад, LPS), який активує iNOS у макрофагах. Антипухлинна дія iNOS-генерованого NO пов'язана, зокрема, з індукцією апоптозу
Локалізація гена	12 хромосома	7 хромосома	17 хромосома

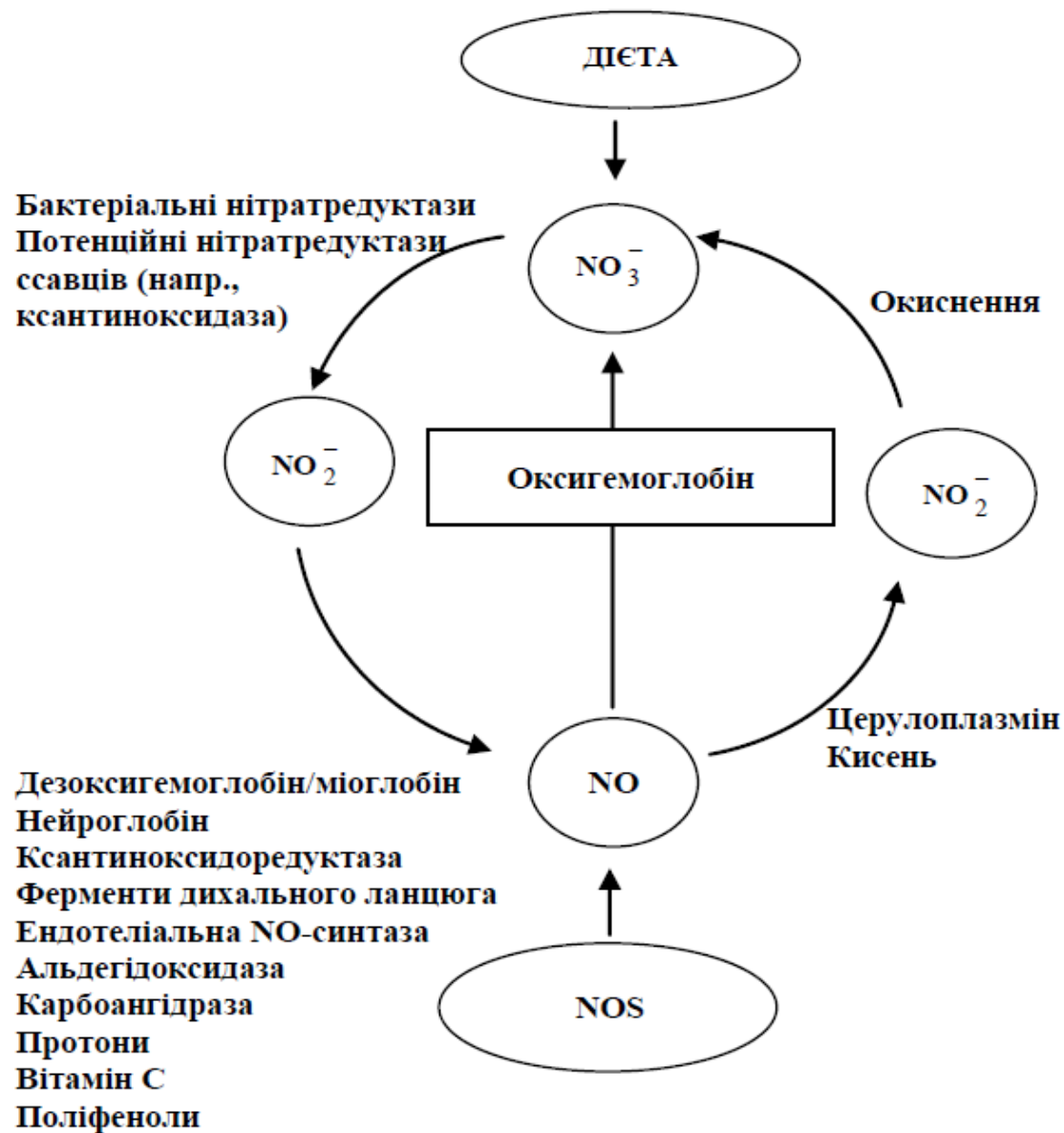
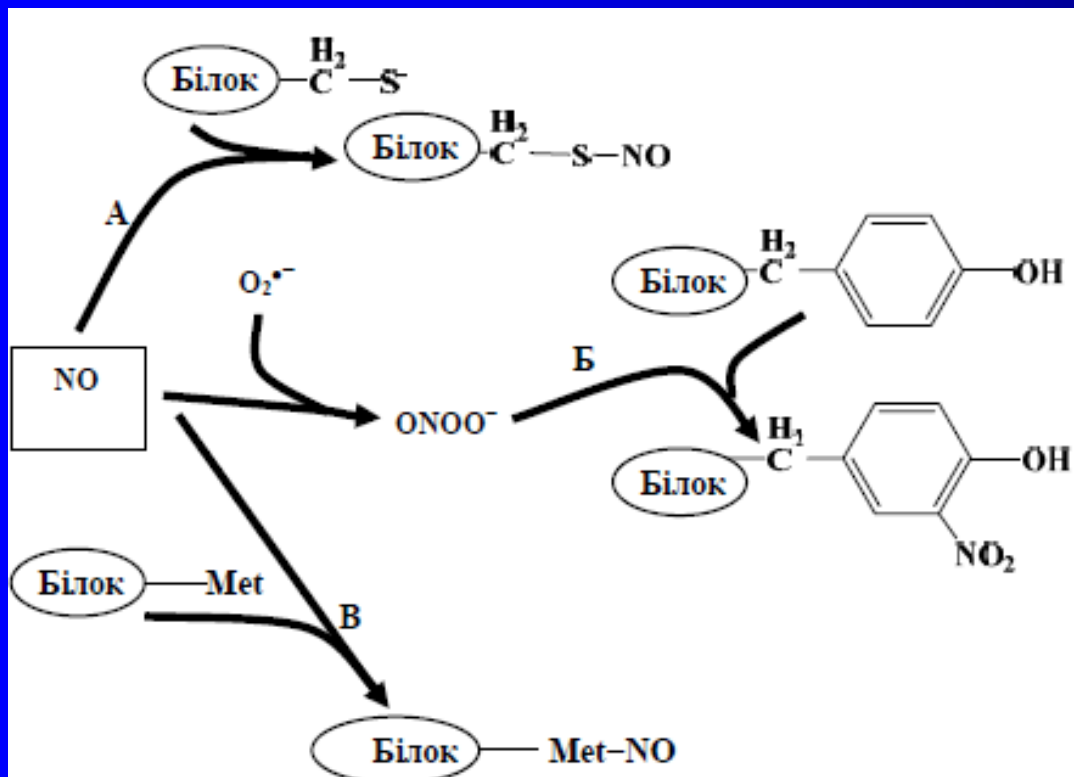
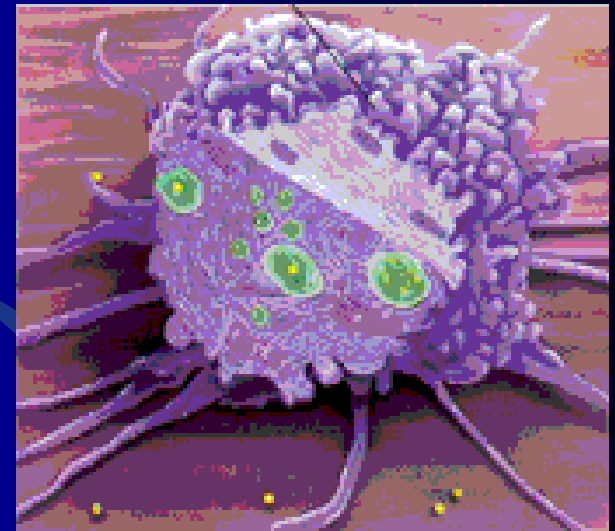
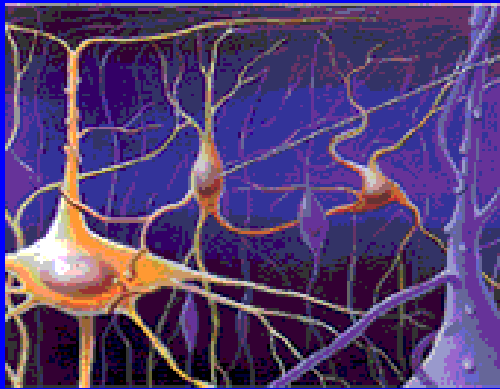


Схема циклу оксиду азоту в організмі ссавців

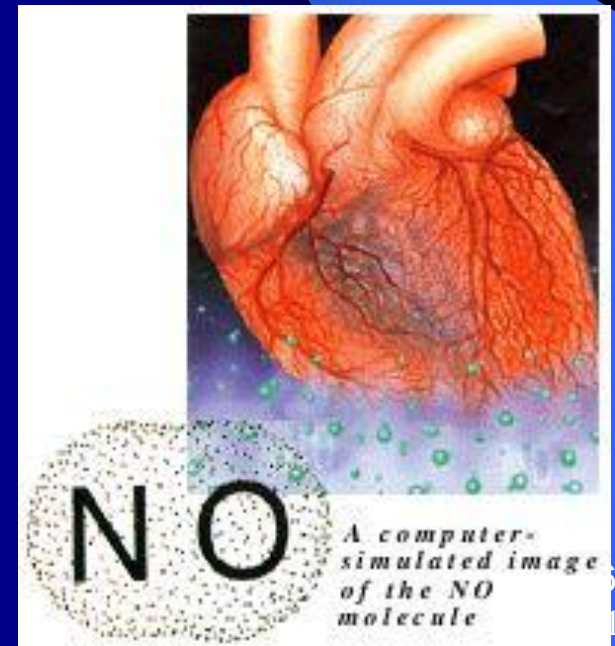


**Модуляція функцій білків
шляхом S-нітрозилювання їхніх молекул**

Блок-мішень S-нітрозилювання	Ефект S-нітрозилювання
NMDA-R	Зменшення чутливості до глутамату
Ріанодиновий рецептор	Збільшення тривалості відкриття каналу
β -арестин	Посилення інтерналізації рецепторів
JNK1	Інгібування кіназної активності
HSP90	Інгібування шаперонової активності
Протеасома	Інгібування протеасомальної активності 26S
Каспази	Інгібування протеазної активності
MMPs	Активація металопротеїназної активності
Akt	Інгібування кіназної активності
PTEN	Інгібування фосфатазної активності
Блок-мішень S-нітрозилювання	Ефект S-нітрозилювання
SHP2	Інгібування фосфатазної активності
Ptx2	Інгібування антиоксидантних властивостей
COX2	Активація синтезу простагландинів
ApoE	Зниження здатності зв'язуватися з LDL-рецепторами
Комплекс I	Інгібування мітохондріального дихання
Комплекс IV	Інгібування мітохондріального дихання
F1 субодиниця H^+ -АТФази	Інгібування АТФазної активності
Аконітаза	Пригнічення циклу Кребса
ALDH2	Пригнічення метаболізму алкоголю
NOS	Інгібування активності NOS продуктом реакції



NO



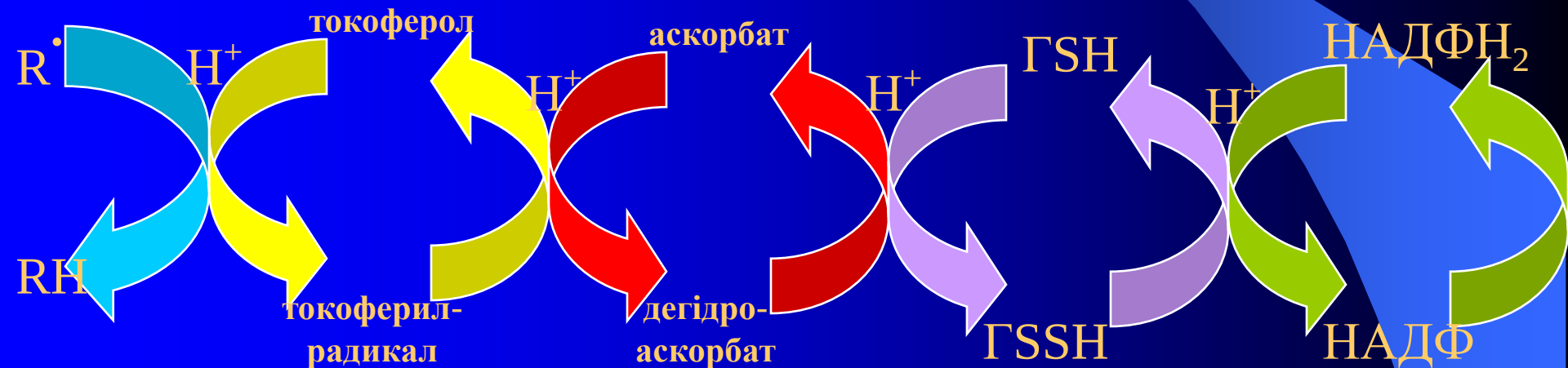
Антиоксидантною називається
система, що забезпечує
інактивацію вільних радикалів,
обмеження та гальмування ПОЛ

ЛАНКИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ

Ланки АО системи	Фактори	Механізми дії
I. «Анти-кисневе»	Ретинол, каротиноїди, рибофлавін	Зменшення вмісту O ₂ у клітині, наприклад, шляхом активації його утилізації, підвищення сполучення процесів окислення і фосфорилування
II. «Анти-радикальне»	Супероксиддисмутаза, токоферол	Трансформація активних радикалів в "нерадикальні" з'єднання, "гасіння" вільних радикалів органічними сполуками
III. «Анти-перекисне»	Глютатіон-пероксидази, каталаза	Інактивація гідроперекисів ліпідів, наприклад, при їхньому відновленні

КОМПОНЕНТИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ

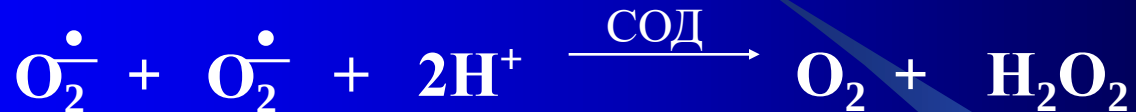
I. Антирадикальний ланцюг-переносник H^+ від систем біологічного ферментативного окиснення до «гасителів» вільних радикалів



*ланцюг відновлюваних окисно-відновних (red-ox) станів
глутатіону, аскорбату і α -токоферолу*

II. Антиоксидантні ферменти

1. Супероксиддисмутаза (Cu, Zn-вмісні)



2. Каталаза (містить Fe)



3. Ферменти глутатіонової системи:

Глутатіонпероксидаза (в еритроцитах Se-вмісна)



Глутатіонредуктаза



АКТИВАЦІЯ ПОЛ

□ при надмірному утворенні первинних вільних радикалів (ультрафіолетове та іонізуюче випромінювання, гіпероксія, отруєння чотирьоххлористим вуглецем, гіпервітаміноз D тощо)

□ при порушенні функціонування анти-оксидантних систем (недостатність ферментів: супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-пероксидази, глутатіон-редуктази; дефіцит міді, заліза, селену; гіповітамінози E, C; порушення пентозного циклу)

Зрив системи антиоксидантного захисту призводить до розвитку **синдрому пероксидації**. Він включає:

- пошкодження бар'єрної та матричної функцій клітинних мембран
- інгібування багатьох ферментів
- порушення клітинного ділення
- накопичення токсичних продуктів пероксидної денатурації ліпідів і білків

Дякую за увагу!

